Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
Abteilung: Biochemie der Pflanzen
der Georg-August-Universität Göttingen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ROLLE DES KUPFERS IM PHOTOSYNTHETISCHEN ELEKTRONENTRANSPORTSYSTEM ISOLIERTER CHLOROPLASTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
ERICH F. ELSTNER
aus Sonthofen

Göttingen 1967

Druck und Schreibsatz: Andreas Funke, Offsetdruck,
34 GÖTTINGEN, Paulinerstr. 13
Eingang Gotmarstraße

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut
Abteilung: Biochemie der Pflanzen
der Georg-August-Universität Göttingen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ROLLE DES KUPFERS IM PHOTOSYNTHETISCHEN ELEKTRONENTRANSPORTSYSTEM ISOLIERTER CHLOROPLASTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
ERICH F. ELSTNER
aus Sonthofen

Göttingen 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. A. Trebst
Korreferent: Prof. Dr. Pinson

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Mai 1967

Meiner lieben Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde im Pflanzenphysiologischen Institut, Abt.: Biochemie der Pflanzen der Universität Göttingen in der Zeit von Januar 1965 bis zum Dezember 1966 ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Trebst, danke ich für die Anregung dieser Arbeit und für unzählige, fruchtbare Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Ergebnisse	6
A) Die Rolle des Plastocyanins in der Photosynthese	6
I. Problemstellung und methodisches Vorgehen	6
II. Eigene Ergebnisse	8
a) Auftrennung der digitonin-fragmentierten Chloroplasten durch Ultrazentrifugation und die Verteilung des Kupfers auf die Fraktionen der Aufarbeitung	8
b) Untersuchung der photosynthetischen Aktivität in den bei 20 000 g abzentrifugierten Partikeln aus detergenz-fragmentierten Chloroplasten	10
c) Photosynthetische Aktivität in den kupferfreien, bei 200 000 g gewonnenen Partikeln (P200)	12
d) Anreicherung des Faktors (Plastocyanin) aus dem Überstand der bei 200 000 g abzentrifugierten Partikel, der die NADP-Reduktion mit den Partikeln P200 stimuliert	13
e) Eigenschaften der plastocyanin-abhängigen NADP-Reduktion in den digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200)	
1. Erfordernisse	16
2. Lichtsättigung	17
3. pH-Abhängigkeit	17
4. Konzentrationsoptimum für Elektronendonatorsysteme	17
5. Molare Sättigung für das Plastocyanin im Testsystem	19
6. Hemmung der plastocyanin-stimulierten NADP-Reduktion durch KCN und Salicylaldoxim	20
f) Die photosynthetische Aktivität der digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) nach Gradientenzentrifugation	22

Seite

g) Die Plastocyaninabhängigkeit der chinon-stimulierten Ascorbatphotooxidation in digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) 23

h) Der Vergleich von Cytochrom f und Plastocyanin als Kofaktoren für photosynthetische NADP-Reduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) 24

i) Extraktionsversuche mit lyophilisierten, detergenz-fragmentierten Chloroplasten (P200) 28

B) Der Einfluß von Polyphenoloxidasen auf Photosynthesereaktionen in digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) 33

C) Der Einfluß von Polyphenoloxidase, Tyrosinase und Kupferionen auf Photosynthese-Reaktionen in intakten Chloroplasten P1s1 39

Diskussion 43

Methodik 53

Zusammenfassung 62

Literaturverzeichnis 64

Einleitung

Mit der Isolierung funktionsfähiger Chloroplasten aus Blättern höherer Pflanzen konnte der Mechanismus der Photosynthese in einem zellfreien System untersucht werden[1]. Die ersten Ergebnisse bestätigten die neue Auffassung von der Reaktionsfolge in der Photosynthese, die sich aus den Calvin'schen Versuchen über den Weg des Kohlenstoffs in der Biosynthese der Kohlenhydrate ergeben hatte. Die eigentlichen lichtabhängigen Reaktionen der Photosynthese im Lamellarsystem der Chloroplasten führen zu O_2, $NADPH_2$ und ATP. $NADPH_2$ und ATP reduzieren anschließend in einer Dunkelphase der Photosynthese CO_2 zu Kohlenhydrat. Mit der an Mitochondrien entwickelten Vorstellung vom Elektronentransport in Lamellarsystemen, die jetzt auf die Vorgänge in Chloroplasten übertragen wurde, ließ sich auch die 1935 von Hill entdeckte O_2-Entwicklung mit Fe^{3+}-Ionen in Chloroplasten (Hill-Reaktion) und die Hypothese von van Niel, daß der in Pflanzen bei Licht entwickelte Sauerstoff aus dem Wasser stammt, erklären und mit den neuen Befunden vereinbaren. Über die Kofaktoren dieses Elektronentransports wußte man zunächst noch nichts. Die Lichtreaktionen kann man durch 2 Gleichungen charakterisieren.

1. Die zyklische Photophosphorylierung

$$ADP + Pi \longrightarrow ATP$$

Hier wird in einem zyklischen Prozeß mit einem zyklisierenden Kofaktor (in vitro PMS oder Menadion) ATP gebildet.

2. Die gekoppelte, offenkettige Photophosphorylierung

$$NADP+H_2O+ADP + Pi \longrightarrow NADPH_2 + ATP + 1/2\ O_2$$

Bei dieser lichtabhängigen Reaktion ist die ATP-Bildung der O_2-Entwicklung und der NADP-Reduktion stöchiometrisch. Mit Hilfe des Lichtes muß also in der photosynthetischen NADP-

---

Abkürzungen:

DCPIP = Dichlorphenolindophenol
DAD = Diaminodurol
TMPD = N,N,N',N'-Tetramethyl-para-Phenylendiamin
ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat
NADP = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phoshat
Pi = anorganisches Phosphat
DCMU = 3-(3,4 dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-Harnstoff
Tris = Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
PMS = Phenazonium-Methosulfat

Reduktion eine Redoxspanne von + 815 mV (H_2O/O_2) auf - 320 mV (NADPH/NAPD) überbrückt werden. Die Untersuchungen dieser Prozesse mit physikalisch chemischen Methoden brachten die Vorstellung von 2 Lichtreaktionen, die durch eine Elektronentransportkette miteinander verbunden sind. Physikochemiker konnten wiederum zum ersten Mal genauere Aussagen über die Stellung und Funktion von Substanzen innerhalb des Elektronentransportsystems machen, die von Biochemikern zuvor schon aus Chloroplasten isoliert und beschrieben worden sind. Man stellte sich vor, daß die 2 Lichtreaktionen in Serie geschaltet sind und sich in den Gesamtbetrag des Potentialsprunges vom H_2O/O_2 zum NADPH/NADP-Redoxsystem teilen: Die als 2. Lichtreaktion definierte Lichtaktivierung reduziert eine Substanz mit einem Redoxpotential um 0 Volt, vermutlich ein Plastochinon. Die Elektronen stammen aus dem H_2O, dabei wird Sauerstoff frei. Vom Plastochinon werden die Elektronen sodann über eine Elektronentransportkette auf den Donator der 1. Lichtreaktion mit einem Redoxpotential von +360 mV übertragen (Cytochrom f oder Plastocyanin). Durch den Potentialabfall zwischen den beiden Lichtreaktionen wird Energie frei, die in Form von ATP aufgefangen werden kann. Als 1. Lichtreaktion bezeichnet man die Reaktion eines Pigmentsystems, das langwelliges Licht von 700 mμ stark absorbiert. Durch die 1. Lichtreaktion erfolgt eine Aktivierung auf mindestens -450 mV. Akzeptor in vivo ist das Ferredoxin; im Versuch mit isolierten Chloroplasten kann man auch andere Substanzen, z.B. Ferricyanid oder Chinone verwenden. Auf diese Reaktionen wird noch ausführlich eingegangen.

In einer Dunkelreaktion wird vom Ferredoxin über die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase NADP reduziert. Dieses Elektronentransportsystem wurde noch um weitere Substanzen mit Redoxeigenschaft für den Elektronentransport ergänzt: zwischen die beiden Lichtreaktionen konnte noch ein Cu-haltiger Kofaktor mit einem Redoxpotential von +360 mV, das Plastocyanin, eingeordnet werden, während die Stellung von Cytochrom b_6 und der neuerdings isolierten Substanzen wie Rubimedin[2], einem Protein-Chlorophyll-Komplex und einem Karotin-Proteinkomplex[3] noch unklar sind.

Ähnlich wie die Stellung einiger Kofaktoren im Elektronentransport ist auch die ATP-Bildungsstelle noch nicht eindeutig festzulegen. Es wird allgemein angenommen, daß die Phosphorylierungsstelle zwischen den beiden Lichtreaktionen liegt, und hier wiederum zwischen dem Plastochinon und dem Donator für die 1. Lichtreaktion (Cytochrom f oder Plastocyanin?) An der zyklischen Photophosphorylierung ist nur die 1. Lichtreaktion beteiligt. Man nimmt an, daß in diesem zyklischen Prozeß die vom Pigmentsystem I angeregten Elektronen unter ATP-Bildung wieder mit einem Akzeptor im Elektronentransportsystem vor Pigmentsystem I zurückreagieren. Hemmstoffe sind für die Untersuchung von Photosynthesereaktionen genauso unentbehrlich wie für die Aufklärung der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung.
Ein Beispiel für einen viel verwendeten Hemmstoff ist das DCMU, dessen Hemmstelle hinter der 2. Lichtreaktion lokalisiert wird. Diese Hemmung der Hill-Reaktionen, die vermutlich zwischen dem Quencher der 2. Lichtreaktion (= eine Substanz, die die Fluoreszenz der 2. Lichtreaktion löscht) und dem Plastochinon ansetzt, war sehr wichtig für die Untersuchung des Elektronentransportsystems in vitro, aber auch für Photosyntheseversuche in vivo, da die zyklische Photophosphorylierung nicht durch DCMU beeinflußt wird. Eine ähnliche Wirkung wie DCMU hat auch o-Phenanthrolin.
Salicylaldoxim wurde als Hemmstoff für Cu-Enzyme und -Kofaktoren in Mitochondrien und Chloroplasten beschrieben. Seine Hemmstelle liegt in Chloroplasten vor der 1. Lichtreaktion.
Von den heute bekannten Photosynthesereaktionen der Chloroplasten in vitro wurden schon die Hill-Reaktionen und die Photophosphorylierungsreaktionen erwähnt. Nur die gekoppelte Hill-Reaktion mit NADP als Akzeptor ist physiologisch von Bedeutung. Hill-Reaktion mit anderen Akzeptoren sind jedoch von großer Bedeutung für die Untersuchungen des Elektronentransportsystems der Chloroplasten in vitro. Da sie auch in dieser Arbeit häufig verwendet werden, sollen sie kurz beschrieben werden.

1. Die Hill-Reaktionen

Hier kann man je nach zugesetztem Elektronenakzeptor in vitro unterscheiden in Hill-Reaktion mit K-Ferricyanid, mit Chinonen und mit NADP. In allen Fällen ist die Reduktion des Akzeptors von einer stöchiometrischen O_2-Entwicklung und ATP-Bildung begleitet. Die Hill-Reaktion mit dem physiologischen Akzeptor NADP läuft über Ferredoxin und die flavinhaltige Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase. Beim osmotischen Aufbrechen der ganzen Chloroplasten geht das Ferredoxin in Lösung. Zu Versuchen, in denen NADP als Akzeptor verwendet wird, muß das Ferredoxin wieder zugesetzt werden. Die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase geht weniger leicht in Lösung. Um eine Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase-Abhängigkeit der NADP-Reduktion zu zeigen, läßt man osmotisch aufgebrochene Chloroplasten über Nacht bei 20°C in Pufferlösung (pH 7,6) stehen[4]; nach diesem "Altern" der Chloroplasten findet sich die Reduktase nach anschließender Zentrifugation im Überstand und kann daraus isoliert werden. Den gleichen Effekt wie das Altern hat auch eine Behandlung der intakten Chloroplasten mit Detergentien.

Durch Alterungsprozeß und Detergenzbehandlung wird ähnlich wie durch DCMU-Zugabe die 2. Lichtreaktion irreversibel ausgeschaltet. Der Elektronentransport ist dadurch unterbrochen, in einer Hill-Reaktion wird kein O_2 mehr entwickelt. Ein Teilstück des Elektronentransportsystems ist jedoch intakt geblieben: Man kann nämlich die Photooxidation über die 2. Lichtreaktion durch einen künstlichen Elektronendonator ersetzen. Dadurch wird über das Pigmentsystem I allein und über Ferredoxin und Reduktase im Licht wieder NADP reduziert.

Als solche Donatoren können DCPIP und p-Phenylendiamine (wie DAD und TMPD) dienen. Diese Donatoren werden innerhalb der Reaktionszeit von Ascorbat in Substratmenge (10 µMol) reduziert gehalten und brauchen deshalb nur in katalytischen Mengen zugesetzt werden (0,2 µMole).

Das Elektronentransportsystem ist nach Zugabe künstlicher Donatoren unempfindlich gegen DCMU geworden. Die Elektronen werden also hinter dem DCMU-Block an das Elektronentransportsystem abgegeben.

Die Eintrittsstelle der Elektronen in die Transportkette ist für die einzelnen Donatoren und auch je nach ihrer Konzentration verschieden. Dies ist für Versuche mit Mitochondrien[5] und Chloroplasten[6] von großer experimenteller Bedeutung, denn dadurch können Rückschlüsse auf kleine Teilstücke der Elektronentransportkette gezogen werden, d.h. man bekommt Informationen über die Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen und die Beteiligung von Kofaktoren in diesem Teilstück.

2. Die chinonstimulierte Ascorbat-Photooxidation

In einer Abwandlung der Hill-Reaktion können mit der Ascorbat-Photooxidation ebenfalls Untersuchungen über das Elektronentransportsystem angestellt werden[7,8,9]. Analog der Ersetzbarkeit der Photooxidation des Wassers über die 2. Lichtreaktion durch künstliche Elektronendonatoren, kann anstatt des Wassers als Elektronendonator für die 2. Lichtreaktion auch Ascorbat dienen. Die über die Lichtreaktionen II und I angeregten Elektronen können wie bei einer Hill-Reaktion hinter der 1. Lichtreaktion von einem Chinon mit entsprechend negativem Redoxpotential abgefangen werden. Dabei läßt sich eine der O_2-Aufnahme stöchiometrische ATP-Bildung messen. Das gebildete H_2O_2 kann nachgewiesen werden, wenn die endogene Katalase mit KCN gehemmt wird.
Die zunächst gebildeten Hydrochinone sind autoxidabel, d.h. sie reagieren mit O_2 zu Chinon und H_2O_2:

$$\text{Ascorbat} + \text{Chinon} + \text{ADP} + \text{Pi} \xrightarrow{h\cdot\nu} \text{Hydrochinon} + \text{Dehydroascorbinsäure} + \text{ATP}$$

$$\text{Hydrochinon} + O_2 \longrightarrow \text{Chinon} + H_2O_2$$

Die Summe dieser Reaktionen lautet dann:

$$\text{Ascorbat} + \text{ADP} + \text{Pi} + O_2 \xrightarrow{h\cdot\nu} \text{Dehydroascorbinsäure} + \text{ATP} + H_2O_2$$

Ergebnisse

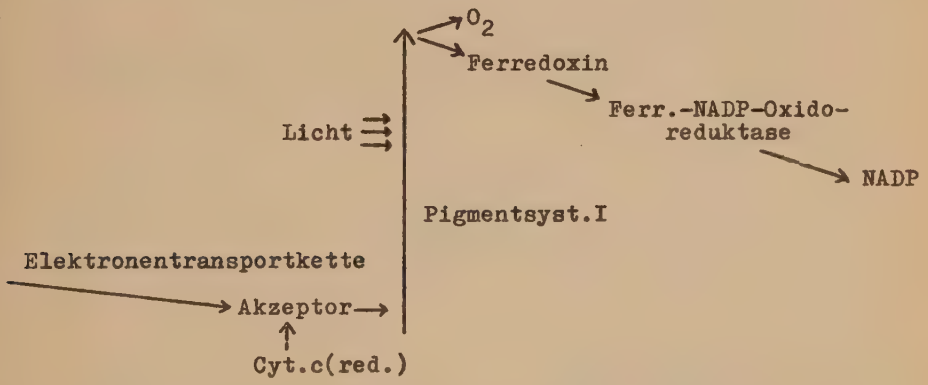
A) Zur Rolle des Plastocyanins in der Photosynthese

I. Problemstellung und methodisches Vorgehen

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Rolle von kupferhaltigen Proteiden in photosynthetischen Reaktionen mit isolierten Chloroplasten untersucht. Eine Beteiligung des Kupfers in der Photosynthese wurde schon 1939 von Green, McCarty und King vermutet[10]. Sie fanden, daß Kupferkomplexbildner die Photosynthese und die Respiration in Chlorella hemmen. Die Hemmstelle für einen solchen Komplexbildner, das Salicylaldoxim, konnte 1963 von Trebst und Eck durch Untersuchungen in isolierten Chloroplasten auf die Elektronentransportkette zwischen der 1. und 2. Lichtreaktion lokalisiert werden. Es wurde daraus geschlossen, daß zwischen der 1. und 2. Lichtreaktion ein kupferhaltiger Faktor wirksam ist[11]. Man hielt ihn für das kupferhaltige Plastocyanin, das 1960 von Katoh und Takamiya[12,13] aus Algen und höheren Pflanzen isoliert wurde. Dieses Kupferproteid hat ein Molekulargewicht von ca. 10 000 und ein Redoxpotential von 370 mV und zeigt im oxidierten Zustand ein breites Absorptionsmaximum bei 597 nm. Wie Katoh und Takamiya[14] zeigen konnten, deutete das Verhalten von Plastocyanin in verschiedenen Photosynthese-Reaktionen auf eine Funktion als Kofaktor des Elektronentransportes zwischen den beiden Lichtreaktionen hin.
Dieser Vorschlag konnte durch spektroskopische Messungen unterstrichen werden. Die Absorptionsänderungen bei 597 nm, dem Absorptionsmaximum von Plastocyanin, nach Lichtblitzen wurden als ein Wertigkeitswechsel des Plastocyanins interpretiert[15,16,17].

Hinweise für eine Funktion des Kupfers in der Hill-Reaktion konnten auch mit kupferverarmten Tomatenblättern gewonnen werden, deren Chloroplasten eine stark verminderte photosynthetische Aktivität haben[18].
Andere Autoren konnten zeigen, daß der Kupfergehalt von Blättern weitgehend auf die Chloroplasten beschränkt ist[19,20].

Es fehlte aber ein direkter enzymatischer Funktionstest für das Plastocyanin.
Nieman u. Vennesland konnten durch Digitoninbehandlung Spinatchloroplasten fragmentieren[21]. Diese digitonin fragmentierten Chloroplasten, die sich in einer Pseudolösung befanden, oxidierten reduziertes Cytochrom c in Licht bei Anwesenheit von O_2, eine Reaktion, die in intakten Chloroplasten nicht möglich ist. Der Reaktionsverlauf blieb unklar, bis es Whatley gelang, den Sauerstoff dieser Reaktion durch NADP zu ersetzen, wenn dem System noch Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase zugesetzt wird[22]. Man konnte jetzt das System von Vennesland so erklären, daß das Cytochrom c erst durch die Detergenzbehandlung Zutritt zu einem Akzeptor in der Elektronentransportkette erhält, der die Elektronen über das autoxidable Pigmentsystem I auf O_2- oder in dem Versuch von Whatley über das Pigmentsystem I, Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase auf NADP überträgt; ein Schema soll diesen Mechanismus darstellen:



Durch Äthanolbehandlung gelang es Nieman u. Vennesland weiter, dieses System in eine Partikelfraktion und einen Überstand aufzutrennen. Dabei zeigte sich, daß eine Cyt.c Oxidation im Licht mit den ausgefällten Partikeln allein nicht möglich ist, sondern erst nach Wiederzugabe des Überstandes[23].
Katoh konnte zeigen, daß sich der Überstand der Äthanolfällung nach Vennesland in einer Cytochrom c Oxidation durch das Plastocyanin ersetzen läßt[13,14].

Die Verbindung zwischen der plastocyaninabhängigen Cytochrom c Oxidation und den Versuchen von Whatley stellten Trebst und Pistorius her indem sie zeigten, daß die NADP-Reduktion in digitonin- und äthanolfragmentierten Chloroplasten ebenfalls plastocyaninabhängig ist. Anstatt reduziertem Cytochrom c verwendeten sie jedoch Ascorbat und DCPIP als Elektronendonatoren[24].
Die Umsatzgeschwindigkeiten dieser Versuche waren jedoch relativ niedrig. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in einer Beschädigung des Lamellarsystems der Chloroplasten durch die Äthanolbehandlung zu suchen. Es sollte deshalb eine andere Methodik zur Untersuchung der Plastocyaninabhängigkeit des Elektronentransportsystems gesucht werden. In dem neuen System sollten folgende Fragen geprüft werden:

1. welche Rolle spielt das Plastocyanin in Chloroplasten,
2. kann man in einem solchen System außer der Plastocyaninabhängigkeit auch noch die Abhängigkeit von Cytochrom f zeigen,
3. haben endogene oder zugesetzte Phenoloxidasen einen Einfluß auf Photosynthesereaktionen,
4. läßt sich eine Aussage über die Struktur machen, an welche das Plastocyanin in intakten Chloroplasten gebunden ist,
5. wie verteilt sich das Kupfer der Chloroplasten auf die Stufen unserer Aufarbeitung.

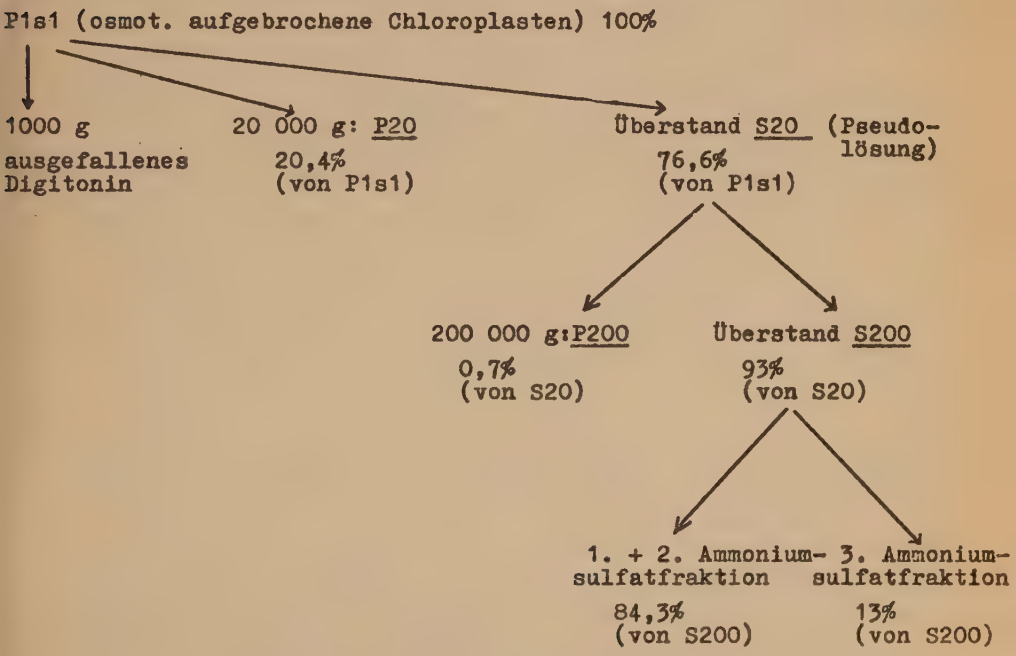
Den Untersuchungen wurde die von Nieman und Vennesland[20] eingeführte Fragmentierung der Chloroplasten mit Detergentien zugrunde gelegt.

II. Eigene Ergebnisse

a) Auftrennung von digitonin fragmentierten Chloroplasten durch Ultrazentrifugation.

Wir erreichten durch Ultrazentrifugation der durch Detergenz-Fragmentierung in Pseudolösung gegangenen Chloroplasten unter Umgehung der Äthanolfällung ebenfalls eine Auftrennung in Partikel und einen chlorophyllfreien Überstand. Diese grobe Auftrennung führten wir noch weiter und erhielten durch Differentialzentrifugation 2 Partikelfraktionen (P20: Niederschlag bei 20 000 g, P200: Niederschlag bei 200 000 g) und aus dem Über-

stand durch Ammoniumsulfatfällung 3 Fraktionen (0 - 0,35 Sättigung, 0,35 - 0,75 Sättigung, 0,75 - 1,0 Sättigung).
Diese Auftrennung führt gleichzeitig zu einer ganz charakteristischen Verteilung des Kupfers auf die einzelnen Fraktionen, begleitet von einer unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Partikelfraktionen in der NADP Reduktion. Die Ammoniumsulfatfraktionen des Überstandes hatten charakteristische Kofaktor- und Enzymeigenschaften.
Ein Schema soll die Trennungsmethode, die zu den einzelnen Fraktionen führt, erläutern. Die Prozentzahlen geben den Kupfergehalt an, bezogen auf die jeweilige Ausgangsfraktion. (Als Fragmentierungsdetergenz diente Digitonin.)



In einem Standardversuch verteilt sich das Chlorophyll wie folgt auf die Partikel:
P1s1 = 100%, P20 = 26% und P200 = 61%.
Für den Kupfergehalt der Partikel, bezogen auf gleichen Chlorophyllgehalt, lassen sich folgende Werte errechnen:

P1s1 enthalten pro mg Chlorophyll $2{,}15 \cdot 10^{-8}$ g Atome Kupfer
P20 " " " " $1{,}7 \cdot 10^{-8}$ g Atome Kupfer
P200 " " " " $2{,}58 \cdot 10^{-9}$ g Atome Kupfer

Durch die Digitonin-Fragmentierung gingen also rund 4/5 des gesamten Kupfers von P1s1 in den Überstand S20 (Pseudolösung) der Zentrifugation bei 20 000 g, während 1/5 an die Partikel P20 gebunden blieb.
Aus dieser Pseudolösung wurden durch Ultrazentrifugation bei 200 000 g Partikel abgeschleudert (P200), die (im Gegensatz zu den Befunden von Anderson, Boardman u. David[25]) nur noch 1/10 des Kupfergehalts pro Chlorophyll der intakten Chloroplasten besitzen. 93% des Kupfers von S20 sind im chlorophyllfreien Überstand dieser Zentrifugation (S200).
Durch Ammoniumsulfatfraktionierung wurde der Überstand S200 in eine gelbbraune Fraktion (0 - 0,75 Sättigung) mit 84% des Kupfers von S200 und eine farblose Fraktion (0,75 - 1,0 Sättigung) mit 13% des Kupfers von S200 aufgetrennt. Wie später festgestellt werden konnte, enthielt die gelbe Fraktion Polyphenoloxidase und die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase, während die farblose Fraktion reduziertes Plastocyanin enthielt.

b) Untersuchung der photosynthetischen Aktivität in den Partikeln aus Detergenz-fragmentierten Chloroplasten

Durch Differentialzentrifugation konnten wir, wie schon gezeigt, 2 Partikelsorten aus einer Digitonin-Fragmentierung von P1s1 gewinnen. Eine Detergenzfragmentierung, die zu Partikeln führt, die mit Elektronendonator im Licht NADP reduzieren, kann nur mit bestimmten Detergentien durchgeführt werden.
Der Verlauf des Fragmentierungsprozesses ist abhängig von der Konzentration des gewählten Detergenz, der Inkubationsdauer und der Temperatur, bei der die Fragmentierung durchgeführt wird.
Eine Cholsäurelösung von 0,5 bis 1% kann, wie 0,75 bis 1% Digitonin, zur Fragmentierung verwendet werden.
Andere Detergentien führten in dieser Konzentration zu photosynthetisch inaktiven Partikeln.
Die unterschiedlichen Photosyntheseaktivitäten von P20 nach verschiedenen Inkubationsbedingungen sollen in Tab.1 und Tab.2 gezeigt werden:

1) Werden die Chloroplasten 30 min. in Eis mit 0,5% Cholsäurelösung inkubiert, so ist mit den Partikeln P20 eine Hill-Reaktion mit O_2-Entwicklung und stöchiometrischer NADP-Reduktion zu messen. Durch Zusatz von Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase läßt sich in einer NADP-Reduktion mit Asc./DCPIP als Elektronendonatoren keine Erhöhung der Reduktionsraten erzielen.

Tab.1: Photosynthetische Aktivität von fragmentierten Chloroplasten P20, die unter den Bedingungen 1) gewonnen wurden.

	µMole $NADPH_2$ (gebildet in 15 min.)	µMole O_2 (gebildet in 15 min.)
Hill-Reaktion mit Ferricyanid	-	2,4
Hill-Reaktion mit NADP	2,5	2,5
NADP-Reduktion mit Asc./DCPIP und Ferredoxin	2,7	-
NADP-Reduktion mit Asc./DCPIP und Ferredoxin und Reduktase	2,7	-

2) Führt man den Versuch mit einer 1stündigen Inkubation von 1% Cholsäure bei 20°C aus, so ist keine Hill-Reaktion mit O_2-Entwicklung mehr zu messen. Mit Elektronendonatoren läßt sich eine NADP-Reduktion messen, die aber jetzt abhängig vom Zusatz der Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase ist.

Tab.2: Photosynthetische Aktivität von fragmentierten Chloroplasten P20, die unter den Bedingungen 2) gewonnen wurden.

	µMole $NADPH_2$ (gebildet in 15 min.)
NADP-Reduktion mit Asc./DCPIP und Ferredoxin	0,43
NADP-Reduktion mit Asc./DCPIP und Ferredoxin und Reduktase	1,35

c) Photosynthese-Reaktionen in den kupferfreien, bei 200 000 g gewonnenen Partikeln (P200)

Die hochtourig abgeschleuderten Partikel P200 entwickeln in einer Hill-Reaktion keinen Sauerstoff mehr, vermögen jedoch mit Elektronendonator noch NADP zu reduzieren, im Vergleich zu P20 aber mit geringeren Raten (Tab.3).

Tab.3: Vergleich der Partikelfraktionen P20 und P200 einer Digitonin-Fragmentierung.
(Die Partikel wurden jeweils in einer Menge entsprechend 0,4 mg Chlorophyll zugesetzt)

	P20	P200
Hill-Reaktion mit Ferricyanid und DCPIP	1,8 µMole O_2 in 15 min.	-
NADP-Reduktion: (µMole $NADPH_2$ in 15 min.) Zusätze: Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase		
Asc./DAD als Donatorsystem	1,65	0,6
Asc./DCPIP als Donatorsystem	1,95	1,5

Die Reaktivierung der NADP-Reduktion in P200

Eine dem Chlorophyllgehalt der Partikel P200 im Versuchsansatz entsprechende Menge des kupferhaltigen Überstandes S200 müßte die Raten der NADP-Reduktion stimulieren, wenn entsprechend dem Kupferverlust von P200 Plastocyanin in Lösung gegangen ist (Tab.4)

Tab.4: NADP-Reduktion der Partikel P200 mit und ohne Überstand S200

Donator	--	Ascorbat	Asc./DCPIP	Asc./DAD
µMole $NADPH_2$ gebildet in 15 min.	0,12	0,3	1,8	0,8
mit Überstand S200	0,25	0,75	0,6	2,8

Dieser Versuch wurde mit einer 1%igen Digitoninlösung als Detergenz ausgeführt. Mit einer 1%igen Cholsäurelösung lassen sich dieselben Resultate erzielen wie durch Fragmentierung mit Digitonin.
Die Rate der NADP-Reduktion mit Ascorbat steigt durch den Zusatz des Überstandes etwa auf das Doppelte an, während ein weiterer Zusatz von 0,2 µMolen DAD nochmals verdreifacht.

Die Ansätze mit 10 µMolen Ascorbat und 0,2 µMolen DCPIP als Donatorsystem werden im Gegensatz zum DAD-System jedoch nicht durch den Überstand stimuliert, sondern sinken ab (Tab.4). Auf diesen Effekt wird in einem eigenen Kapitel noch eingegangen.

d) Anreicherung des Faktors (Plastocyanin) aus dem Überstand der bei 200 000 g abzentrifugierten Partikel, der die NADP-Reduktion mit den Partikeln P200 stimuliert

Der Überstand der bei 200 000 g abgeschleuderten Partikel ist gelb. Diese Farbe ist wahrscheinlich zurückzuführen auf die in Lösung gegangenen Enzyme Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase und Polyphenoloxidase.
Da anzunehmen war, daß es sich bei dem stimulierenden Faktor um das Plastocyanin handelte, erfolgte die Anreicherung und Reinigung dieses Faktors nach der von Katoh für das Plastocyanin angegebenen Methode[12], die etwas abgewandelt wurde.

1. Acetonfällung des Überstandes S200

Eine Anreicherung des stimulierenden Faktors in S200 auf das 10-fache konnte durch Acetonfällung erzielt werden, wenn anstatt des Überstandes das Dialysat seiner Acetonfällung bis 80% im Versuch zur Photoreduktion von NADP mit P200 eingesetzt wird (s. Tab.5 S.14).
SFD 200 bedeutet Fällung und Dialysat des Überstandes S200.
Das unterschiedliche Verhalten der Donatorpaare Asc./DAD und Asc./DCPIP ändert sich durch die Anreicherung nicht: auch hier werden die NADP-Reduktionsraten mit Asc./DCPIP als Donatorsystem durch den Zusatz von SFD200 stark herabgesetzt, während Asc./DAD und Ascorbat allein als Donatoren mit SFD200 eine Stimulierung der NADP-Reduktion bewirken.

Tab.5: Anreicherung des stimulierenden Faktors durch Acetonfällung des Überstandes S200, gemessen an der NADP-Reduktionsrate mit P200

Donator	--	Ascorbat	Asc./DCPIP	Asc./DAD
µMole $NADPH_2$ in 15 min.	0,12	0,3	1,8	0,85
mit 1ml S200 entsprechend 0,4mg Chlorophyll.	0,25	0,75	0,6	2,8
0,1ml SFD200	0,4	1,1	0,8	2,0

2. Ammoniumsulfatfällungen

Aus dem Extrakt SFD200 wurden durch Ammoniumsulfatfällungen 3 Fraktionen erhalten:
die Fraktion von 0 bis 35% Sättigung ergab (in verdünnter Pufferlösung aufgenommen) eine dunkelbraune Lösung,
die von 40 bis 75% Sättigung eine ockergelbe Lösung.
Der Überstand der abzentrifugierten 2. Fraktion ist farblos. Versetzt man diese Lösung jedoch mit 1 Tropfen Ferricyanidlösung, so wird sie sofort himmelblau. Durch Sättigung mit Ammoniumsulfat bis 100% ergibt sich als 3. Fraktion ein blauer Niederschlag, der in Puffer aufgenommen nach Dialyse eine stimulierende Wirkung auf die NADP-Reduktion mit P200 zeigt (Tab.6).

Tab.6: Vergleich der 3. Ammoniumsulfatfraktion mit dem Überstand S200

Gemessen werden µMole $NADPH_2$ nach 15 min. Lichtreaktion mit Asc./DAD als Elektronendonatorsystem und sättigenden Mengen an Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase.

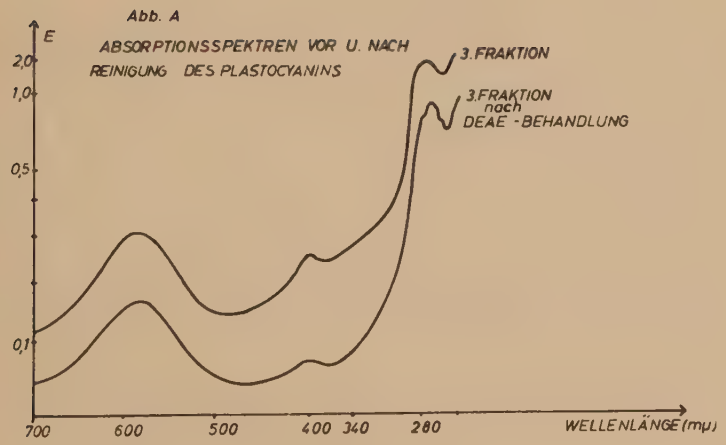
Zusätze: ---	sättigende Menge S200	0,2 ml 3.Fraktion
0,5	2,95	2,85

Die blaue, durch die Spektren (siehe Abb.A) als Plastocyanin identifizierte Substanz wurde nach der (etwas abgewandelten)

Methode von Katoh[27] an DEAE-Zellulose-Säulen weitergereinigt und nach Dialyse erneut im Test mit Partikeln P200 zur NADP-Reduktion eingesetzt (Tab.7).

Tab.7: Der Einfluß des gereinigten Plastocyanins auf die NADP-Reduktion mit den bei 200 000 g gewonnenen digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200)
Gemessen werden µMole $NADPH_2$ in 15 min. Licht.

Donator	---	Ascorbat	Asc./DCPIP	Asc./DAD
-	0,18	0,3	1,55	0,57
mit 0,2 ml gereinigtem Plastocyanin	0,15	1,25	3,35	2,4



Durch die Aufarbeitung des Überstandes S200 wurde der ursprüngliche Hemmeffekt auf die NADP-Reduktion mit DCPIP als Donator ausgeschaltet und in einen Stimulierungseffekt umgewandelt. Das DCPIP kann also in der plastocyanin-stimulierten NADP-Reduktion mit digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) genauso als Donator dienen wie es imstande ist, in intakten Chloroplasten mit der 2. Lichtreaktion als Elektronendonator zu konkurrieren.
Die Reduktionsraten von NADP mit P200 sind bei Verwendung von gereinigtem Plastocyanin mit DCPIP als Donator sogar noch besser als mit DAD.

e) Eigenschaften der plastocyanin-abhängigen NADP-Reduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200)

Die Aktivität bezogen auf das Testsystem für den Nachweis der Beteiligung des Plastocyanin an der NADP-Reduktion mit P200 schwankte je nach Aufarbeitung (Herkunft des Spinats und Jahreszeit) mit dem Donatorsystem Asc./DCPIP von 2,5 bis 4,5 µMolen, mit Asc./DAD von 1,5 bis 3,0 µMolen in 15 min. Licht. Es wurden stets (wenn nicht anders vermerkt) Partikel in einer Menge eingesetzt, die 0,4 mg Chlorophyll entsprachen.

1. Die Erfordernisse der NADP-Reduktion in den digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200)
   Die Abhängigkeit der NADP-Photoreduktion mit P200 von den einzelnen Faktoren zeigt die Tab.8.

Tab.8: Erfordernisse der NADP-Reduktion mit gewaschenen P200

Das komplette Testsystem enthält: P200 von 0,4 mg Chlorophyllgehalt, 10 µMole Ascorbat, 0,2 µMole DAD, sättigende Mengen Ferredoxin, Reduktase, Plastocyanin und 6 µMole NADP.

	µMole $NADPH_2$ gebildet in 15 min.
Gesamtansatz	3,0
- DAD	1,15
- Ascorbat	0,09
- Plastocyanin	0,43
- Ferredoxin	0,16
- Reduktase	1,9

2. Die Lichtsättigung des Testsystems

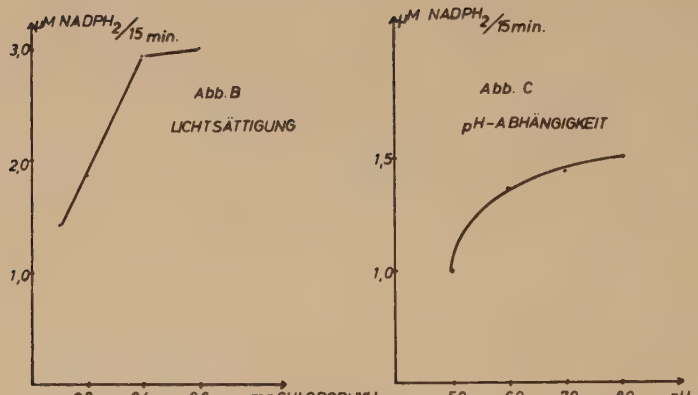
Um die für den Versuch optimale Partikelmenge festzustellen, wurde ein Lichtsättigungsversuch mit verschiedenen Mengen an P200 bei gleichbleibender Beleuchtungsstärke unternommen: Der Kurvenverlauf auf Abb.B läßt unter den Bedingungen des Versuchsansatzes 0,4 mg Chlorophyll pro Gefäß als sättigende Partikelmenge erkennen. Vorausgesetzt ist natürlich, daß man mit der Zugabe aller anderen Faktoren über der Sättigungsgrenze liegt.

3. Die pH-Abhängigkeit des Testsystems

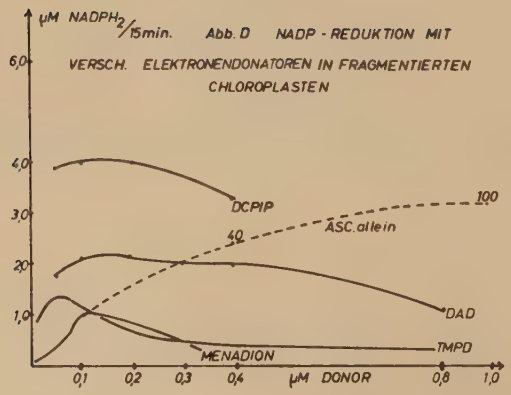
Ein pH von 8,0 erwies sich als optimal für die NADP-Reduktion mit Asc./DAD als Elektronendonatorsystem. Dieses Optimum bei pH 8 stimmt überein mit dem Optimum, das Katoh mit digitoninbehandelten Chloroplasten (eine Fraktion, die unserem Überstand der Zentrifugation bei 20 000 g = S20 entspricht) und 0,05 µMolen reduziertem Plastocyanin als Elektronendonator erhielt[14]. (siehe Abb.C)

4. Konzentrationsoptima für Elektronendonatoren

In Versuchen mit isolierten Chloroplasten verwendet man häufig eine Konzentration des Donators von 0,2 µMolen, was dem Optimum für intakte Chloroplasten entspricht.
Die Konzentrationsoptima für Donatoren, die in unserem Testsystem verwendet wurden, sind auf Abb.D wiedergegeben.
Daraus ist zu ersehen, daß 0,1 µMol für DAD und DCPIP, 0,05 µMol für TMPD eine optimale NADP-Reduktion gewährleisten.
Menadion ist als Donator ungeeignet.
Ascorbat kann in hohen Konzentrationen selbst als Donator dienen.



LICHTSÄTTIGUNG UND pH-ABHÄNGIGKEIT DER NADP-REDUKTION IN FRAGMENTIERTEN CHLOROPLASTEN



5. Bestimmung der molaren Sättigungskonzentration für Plastocyanin im Testsystem mit P200

Um zu untersuchen, bei welcher molaren Zugabe unser System zur NADP-Reduktion mit P200 an Plastocyanin gesättigt ist, wurde in einer Versuchsreihe das Volumen Plastocyaninlösung ermittelt, das gerade zur Sättigung unseres Systems genügt. Dabei erwiesen sich mit frischem Plastocyanin 0,1 ml als sättigend (siehe Spektrum b auf Abb.E).
Zur Bestimmung der Mole Plastocyanin in dem zugegebenen Volumen wurde der von Katoh ermittelte molare Extinktionskoeffizient von $9{,}8 \cdot 10^6$ cm^2 pro Mol Protein bei 597 mμ zugrunde gelegt. Unsere frische Plastocyaninlösung hatte bei 597 mμ eine Extinktion von 0,1. Daraus errechnet sich eine Molarität von 10,2 mμMolen/ml der Plastocyaninlösung. Somit sind in unserem Testsystem 1,02 mμMol Plastocyanin ausreichend für eine optimale NADP-Reduktionsrate, bezogen auf eine Partikelmenge von 0,4 mg Chlorophyll in 15 min. Licht bei 35 000 Lux.

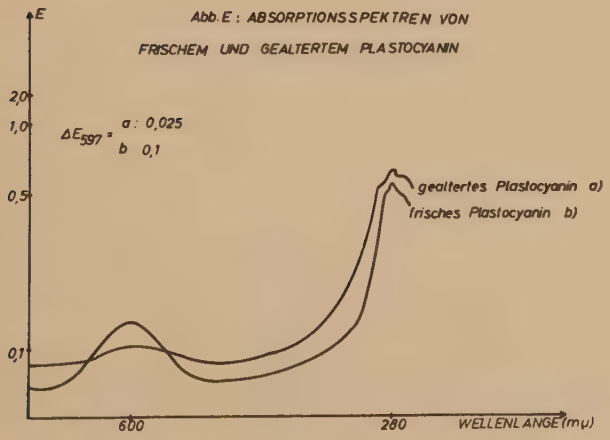


Abb.E: ABSORPTIONSSPEKTREN VON FRISCHEM UND GEALTERTEM PLASTOCYANIN

Zur Überprüfung dieses Wertes wurde derselbe Versuch mit einer gealterten Plastocyaninlösung angestellt, deren Extinktion bei 597 mμ nur 1/4 vom frischen Plastocyanin betrug, nämlich 0,025.

Bei der Ermittlung des sättigenden Volumens für unseren Test erwiesen sich 0,4 ml als sättigend, was eine Molarität von 1,04 mμMol/0,1 ml ergibt (siehe Spektrum a auf Abb.E).
In einem anderen Versuch konnte gemessen werden, daß der Extinktionsabfall bei 597 mμ im Laufe des Alterungsprozesses genau proportional dem Aktivitätsverlust des Plastocyanins ist.

6. Hemmung der plastocyanin-stimulierten NADP-Reduktion durch KCN und Salicylaldoxim

Cyanid-Ionen hemmen die kupferhaltigen Enzyme Cytochromoxidase und Polyphenoloxidase. So könnte man erwarten, daß auch das Plastocyanin von Cyanid-Ionen gehemmt wird, indem das proteingebundene Kupfer durch die Cyanid-Ionen komplexiert wird. Die Empfindlichkeit kupfernaltiger Proteine gegenüber Cyanidionen ist jedoch verschieden.
Eine Tyrosinase aus Kartoffeln wird von $3{,}3 \cdot 10^{-3}$ m KCN zu 90% gehemmt. Im Gegensatz dazu ist die zur Hemmung des Plastocyanins in der NADP-Reduktion nötige KCN-Konzentration 3 mal höher, denn wie Abb.F zeigt, ist erst bei einer Konzentration von 10^{-2} m KCN eine völlige Hemmung zu erreichen.
Cyanid-Ionen zeigen wie Salicylaldoxim einen unterschiedlichen Hemmeffekt, je nachdem ob man als Elektronendonator DAD oder DCPIP verwendet. Wie Abb.G zeigt, wird die NADP-Reduktion mit Asc./DAD als Donatorsystem sowohl durch 10^{-2} m Salicylaldoxim als auch durch 10^{-2} m KCN völlig gehemmt.
Mit Asc./DCPIP als Donatorsystem sinken die Reduktionsraten bei gleicher Hemmstoffkonzentration jeweils nur auf einen Betrag von ungefähr 1 μMol/15 min. Lichtreaktion. Eine vollständige Hemmung ist im Indophenolsystem nicht möglich.
Dieser Effekt steht in Übereinstimmung damit, daß das DCPIP-System auch ohne Plastocyanin-Zugabe bereits eine deutliche NADP-Reduktionsrate zeigt (siehe Tab.7).

Abb. F HEMMWIRKUNG VON CYANID-IONEN AUF PLASTOCYANIN IM DAD-SYSTEM

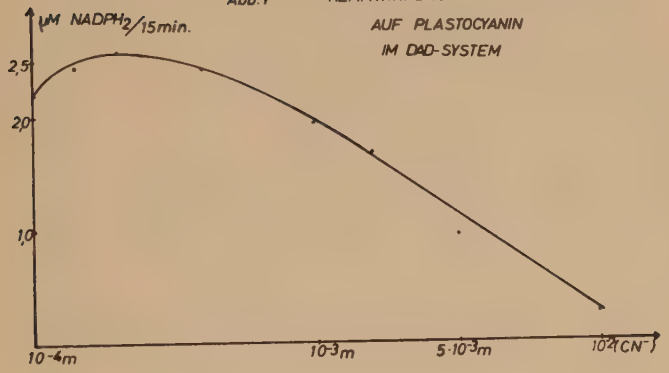
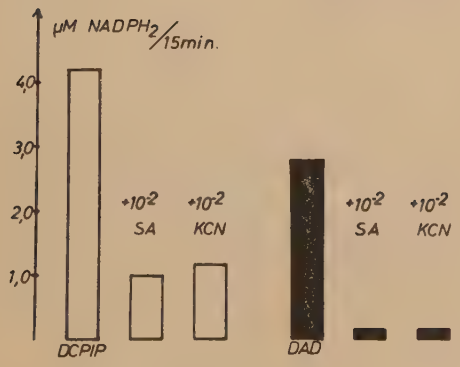
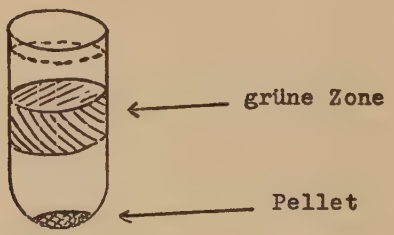


Abb. G HEMMWIRKUNG VON 10^{-2}m KCN UND 10^{-2}m SALICYLALDOXIM IM DAD-U. DCPIP-SYSTEM

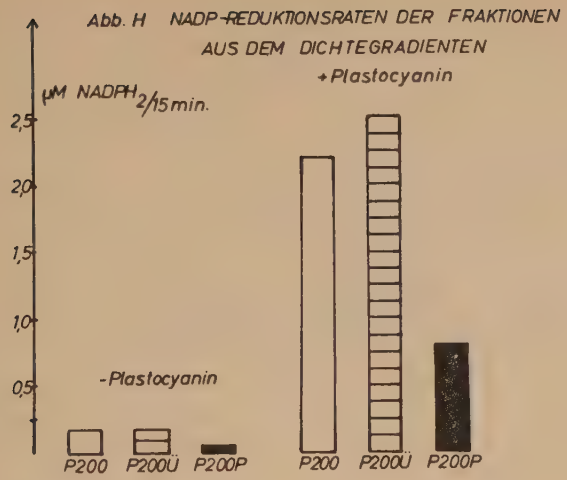


f) Die photosynthetische Aktivität von digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) nach Gradientenzentrifugation

Bei einer Fragmentierung von Chloroplasten mit Detergentien, wie sie hier angewendet wird, entstehen keineswegs Partikel von einheitlicher Größe, gemessen an ihren Sedimentationskonstanten. Es gelingt daher durch Differentialzentrifugation (noch besser mit Hilfe eines Dichtegradienten) bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten und entsprechenden Zentrifugationszeiten unterschiedliche Partikel abzuschleudern.
Der Vergleich von 2 Fraktionen, 20 000 und 200 000 g ergab, wie schon beschrieben, verschiedene photosynthetische Aktivitäten dieser Fraktionen.
Auch die bei 200 000 g gewonnene Partikelfraktion ist nicht einheitlich, sondern läßt sich mit Hilfe eines Dichtegradienten weiter auftrennen. Wird ein linearer Dichtegradient von 10 - nach 40% Saccharoselösung vorsichtig mit der Fraktion P200 überschichtet und im Ausschwingrotor 2 Stdn. bei 40 000 g zentrifugiert, so erfolgt Auftrennung in eine grüne, etwa 2 cm breite Zone in der Bechermitte und ein Pellet am Becherboden:



Die grüne Zone wird abgehebert , bei 200 000 g abgeschleudert und in Pufferlösung aufgenommen (= P200 Ü).
Das Pellet wird ebenfalls aufgenommen (= P200 P) und beide Fraktionen auf ihre Aktivität und Plastocyaninabhängigkeit in der NADP-Reduktion geprüft (siehe Abb.H).



Wie Abb.H. zeigt, lassen sich die digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) im Dichtegradienten in eine schwer sedimentierende, sehr gut mit Plastocyanin reaktivierbare und eine schneller sedimentierende, inaktivere Fraktion auftrennen.

g) Die Plastocyaninabhängigkeit der chinonstimulierten Ascorbatphotooxidation in digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200)

Wie eingangs diskutiert wurde, ist die chinonstimulierte Photooxidation von Ascorbat eine vergleichsweise einfach zu verfolgende Reaktion des Pigmentsystems I. In einer plastocyaninabhängigen Reaktion können in digitonin-fragmentierten Chloroplasten die vom Ascorbat über den Donator abgegebenen und durch das Pigmentsystem I angeregten Elektronen auf ein Chinon von entsprechendem Redoxpotential (wie Anthrachinon mit -250 mV) und von diesem wiederum (an Luft) auf den Sauerstoff übertragen werden.
Die Plastocyaninabhängigkeit dieser Reaktion konnten erstmals Trebst und Pistorius mit digitonin- und äthanolfragmentierten Chloroplasten zeigen[24].

Mit digitonin-fragmentierten Chloroplasten P200, die über einen Gradienten wie oben beschrieben noch weiter aufgetrennt wurden, konnte ebenfalls eine plastocyaninabhängige Ascorbat-photooxidation gezeigt werden. Wenn KCN zur Hemmung der endogenen Katalase zugesetzt wurde, konnte das gebildete H_2O_2 nachgewiesen werden.
Tab.9 zeigt die Abhängigkeit dieser Reaktion von Plastocyanin mit P200S:

Tab.9: Die Abhängigkeit der chinonstimulierten Ascorbat-Photooxidation von Plastocyanin mit P200S (mit 10^{-3} m KCN, 0,2 mg Chlorophyll in 10 min. Licht).

Zusätze in µMol	µA O_2 aufgen.	µMol H_2O_2 gebildet
0,2 Anthrachinonsulfonsäure	0,1	--
10 Asc., 0,2 DAD, 0,2 Anthra.	0,25	0,36
" " " 1 µMol Plastocyanin	6,75	3,15
" -- " "	4,5	2,1
" " -- "	0,55	0,51

Wie Tab.9 zeigt, ist ohne Ascorbat, Anthrachinon und Plastocyanin keine oder nur eine geringe O_2-Aufnahme zu messen, entsprechend auch kein oder nur wenig gebildetes H_2O_2. Mit allen nötigen Faktoren sind in 10 min. Licht 6,75 µA O_2-Aufnahme zu messen, wobei 50% des aufgenommenen O_2 im H_2O_2 wiederzufinden sind. Ohne den Donator DAD werden nur 2/3 dieser O_2-Menge aufgenommen, davon sind wiederum nur 50% im H_2O_2 zu finden; ohne KCN läßt sich gar kein H_2O_2 nachweisen.
In einem anderen Versuch mit den Partikeln P200P sind die O_2-Aufnahmeraten µm 10% niedriger als mit P200S.

h) Vergleich von Cytochrom f und Plastocyanin als Kofaktoren für die photosynthetische NADP-Reduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200)

Das von Hill entdeckte und in neuerer Zeit hauptsächlich mit physikalisch-chemischen Methoden untersuchte Cytochrom f hat, wie das Plastocyanin, ein Redoxpotential von +360 mV. Seine enge

Verknüpfung mit dem Pigmentsystem 1 wurde in der Einleitung erwähnt; ebenso die Möglichkeit, daß neben dem Cytochrom f noch ein anderes Donatorsystem für die 1. Lichtreaktion vorhanden zu sein scheint.
Wie die bisher diskutierten Ergebnisse gezeigt haben, ist Plastocyanin ein Kofaktor für die NADP-Photoreduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten P200. Um zu untersuchen, ob das Cytochrom f in diesem Testsystem mit P200 neben oder anstelle von Plastocyanin beteiligt ist, wurde nach der Anleitung von Davenport und Hill[26] Cytochrom f hergestellt und mit digitonin-fragmentierten Chloroplasten getestet.
Anstelle von Petersilie, aus der Hill Cytochrom f hergestellt hat, wurden Spinatblätter als Ausgangsmaterial verwendet. Die Reinigung des Cytochrom f wurde über das Absorptionsspektrum verfolgt.
Abb.I zeigt ein Spektrum unseres angereicherten Cytochrom f.

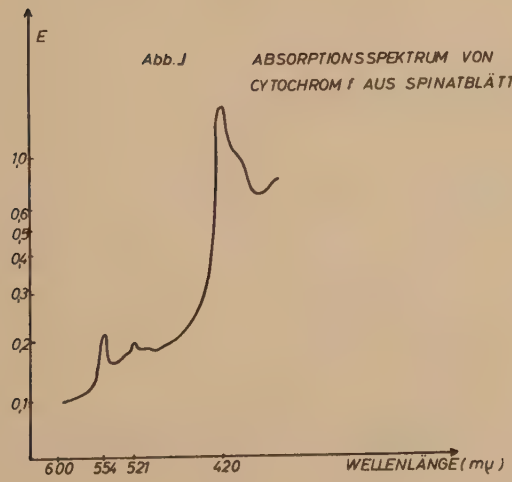


Abb.J ABSORPTIONSSPEKTRUM VON CYTOCHROM f AUS SPINATBLÄTTERN

Der Versuch, ob das Cytochrom f mit irgendeinem der beschriebenen Elektronendonatoren die NADP-Reduktion in detergenz-fragmentierten Chloroplasten anstatt des Plastocyanins stimulieren kann, brachte ein negatives Ergebnis. Nur die Zugabe von Plastocyanin bringt die Erhöhung der NADP-Reduktionsraten (Tab.10).

Tab.10: Vergleich von Cytochrom f und Plastocyanin als Kofaktoren der photosynthetischen NADP-Reduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten mit verschiedenen Elektronendonatoren.
(Die Partikel P200 wurden in 1% Digitonin aufgenommen)

				µMole $NADPH_2$ gebildet in 15 min. Licht
P200 +	Asc./DCPIP			1,3
+	Asc./DAD			0,26
+	Asc./TMPD			0,19
P200 +	Asc./DCPIP	+	Cyt.f (1,55 mµMole)	1,15
+	Asc./DAD	+	Cyt.f	0,17
+	Asc./TMPD	+	Cyt.f	0,20
P200 +	Asc./DCPIP	+	Cyt.f + Plastocyanin (1 mµMol)	2,8
+	Asc./DAD	+	----- + Plastocyanin	2,0
+	Asc./TMPD	+	Cyt.f + Plastocyanin	0,98

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den kürzlichen Befunden von Wessels[27], der durch Digitoninfragmentierung (1,3%ige Lösung) und Zentrifugation im Dichtegradienten eine Cytochrom f-freie Partikelfraktion erhalten hat, die allein durch Plastocyanin und nicht durch Cytochrom f-Zusatz stiumliert wird.

Eine direkte Untersuchung der Partikel P200 auf ihren Cytochrom f-Gehalt war uns methodisch nicht möglich.
Da es möglich war, daß ein gewisser Restgehalt an Cytochrom f das System noch sättigt, wurde versucht, analog der Extraktion des Cytochrom f aus Blattmaterial, die Partikel P200 mit ammoniakalischem Äthanol zu extrahieren, um den Cytochrom f-Gehalt zu erniedrigen. In diesen Partikeln wurde der Einfluß von Cytochrom f auf die NADP-Reduktion geprüft.

Mit keinem der eingesetzten Donatoren konnte eine Cytochrom f-stimulierte NADP-Reduktion in solchen äthanolbehandelten, digitonin-fragmentierten Chloroplasten gemessen werden. Die absoluten NADP-Reduktionsraten sanken zwar durch die Äthanolbehandlung ab, die prozentuale Stimulierung bei Zugabe von Plastocyanin ist jedoch gleich wie in unbehandelten Partikeln. Tab.11 zeigt die Reduktionsraten für das Donatorsystem Asc./DAD (mit 50 µMolen Ascorbat pro Ansatz).

Tab.11: Der Einfluß von Cytochrom f und Plastocyanin auf äthanolextrahierte, digitonin-fragmentierte Chloroplasten (P200 Äth.ex.) Die Partikel wurden in 1% Digitonin aufgenommen.

		µMole $NADPH_2$ in 15 min.
P200 Äth.ex.	+ ---	0,1
	+ Plastocyanin (1 mµMol)	0,8
	+ Plastocyanin + Cytochrom f (1,55 mµMole)	0,75

Mit Hilfe einer indirekten Methode wird die Verfolgung der Extraktion des Cytochrom f durch Äthanol möglich: Das Cytochrom f besitzt eine hohe Katalase-Aktivität[28]. Die Messung dieser Reaktion ist auch in Partikeln möglich. Die Zersetzung von H_2O_2 durch die Partikel P200 und extrahierte, digitonin-fragmentierte Chloroplasten läßt auf diese Weise Rückschlüsse auf den Cytochrom f-Gehalt der Partikel zu. Abb.K zeigt die Katalase-Aktivitäten von P200 und extrahierten P200. Der Meßwert bei 1 Minute Reaktionsdauer ist bei der hohen Wechselzahl der Katalase repräsentativ für die Aktivitäten. Die Katalase-Aktivität der extrahierten Partikel P200 hat um etwa 55% gegenüber den nichtextrahierten abgenommen; wenn diese Abnahme Hand in Hand geht mit einer Cytochrom f-Extraktion oder Zerstörung, die NADP-Reduktion aber durch Cytochrom f-Zusatz nicht stimulierbar ist, so stimmen wir mit neueren Befunden überein, die aussagen, daß Cytochrom f nicht nach dem Plastocyanin in der Reihenfolge des Elektronentransportsystems stehen kann, sondern "daneben" oder davor.

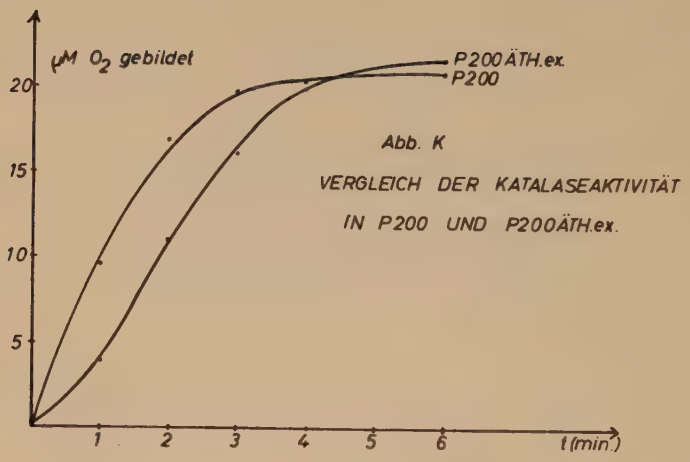


Abb. K

VERGLEICH DER KATALASEAKTIVITÄT IN P200 UND P200ÄTH.ex.

i) Extraktionsversuche mit lyophilisierten, detergenzfragmentierten Chloroplasten (P200)

Die Partikel P200 verlieren durch Gefriertrocknung nur wenig ihrer photosynthetischen Aktivität und sind im Exsikkator bei 4°C haltbar (wie hier nicht weiter belegt werden soll).

1. Extraktion mit Äthanol-Wasser-Gemischen

Durch Extraktion von gefriergetrockneten Partikeln P200 mit Äthanol-Wasser-Gemischen gingen etwa 2/3 des Chlorophylls in Lösung, der Rest des Chlorophylls blieb in der Partikelfraktion, die sich im Gegensatz zu unextrahierten P200 jetzt schon bei 20 000 g abzentrifugieren ließ.
Wurden die Partikel nach der Extraktion mit Wasser nachgewaschen, so ging erneut Chlorophyll in Lösung. Bei erneuter Äthanolextraktion dieser gewaschenen Partikel nahmen die nachfolgenden wäßrigen Extrakte eine grün-rot opalisierende Farbe an. Die vereinigten wäßrigen Extrakte können mit Hilfe einer

DEAE-Zellulose-Säule in eine grüne Lösung mit Chlorophyllspektrum und eine orangerote Lösung, deren Absorptionsspektrum einen Karotin-Anteil vermuten läßt, aufgetrennt werden.

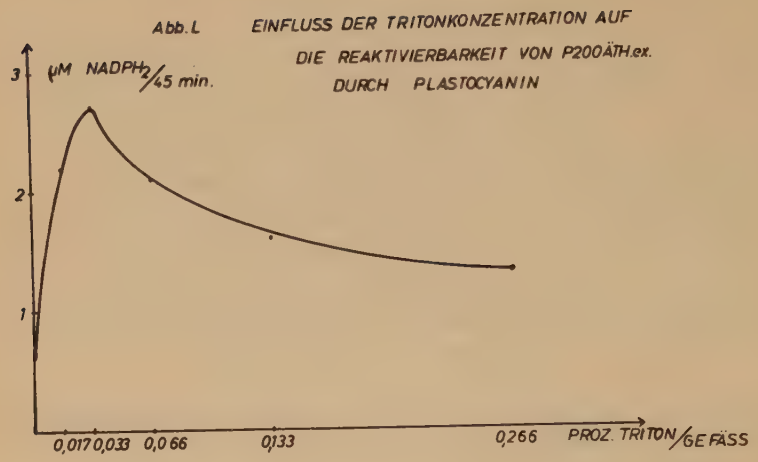
2. Photosynthetische Aktivität der extrahierten Partikel

In extrahierten und gewaschenen digitonin-fragmentierten Chloroplasten läßt sich die NADP-Reduktion nicht mehr durch Plastocyanin reaktivieren. Werden die Partikel jedoch in einer Detergenzlösung aufgenommen, so ist wieder eine NADP-Reduktion und ihre Stimulierung durch Plastocyanin zu messen. Der Zusatz der grünen und roten Waschextrakte bleibt ohne Einfluß.
Tab.12 zeigt den Einfluß verschiedener Detergentien auf die Photoreduktion von NADP mit äthanolextrahierten, lyophilisierten P200 unter Zusatz von Plastocyanin.

Tab.12: Einfluß verschiedener Detergentien auf die NADP-Reduktion mit äthanolextrahierten, digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200 Äth. ex.).

	µMole $NADPH_2$ in 15 min. Licht
P200 + DCPIP/Asc.	1,1
+ Plastocyanin	3,9
	in 45 min. Licht
P200 Äth.ex. + DCPIP/Asc.	0,5
+ Plastocyanin	0,7
+ 0,5 ml 1% Triton	3,1
+ 1 ml 1%Digitonin	2,0
+ 1 ml 1% Cholsäure	1,2
+ 1 ml 0,2% BRIJ	1,1

1 ml 0,2% Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid und 1 ml 0,2% Dodecylsulfat blieben ohne Einfluß.
Wie schon bei den Detergenz-Fragmentierungsversuchen gefunden wurde, sind nicht alle Detergentien gleichermaßen in der Lage, eine Veränderung nur an einer ganz bestimmten Stelle der Chloroplastenstruktur (abgesehen von den allgemein auftretenden irreversiblen Veränderungen) herbeizuführen. Die Konzentration des zugesetzten Detergenz ist hier ebenfalls von Bedeutung, denn wie Abb.L zeigt, führt nur eine ganz bestimmte Konzentration zu optimalen NADP-Reduktionsraten.



3. Extraktion digitonin-fragmentierter Chloroplasten mit n-Heptan

Lyophilisierte, digitonin-fragmentierte Chloroplasten zeigen nach einer Extraktion mit n-Heptan ebenfalls keine Stimulierung mehr durch Plastocyanin. Der Überstand der leicht zentrifugierbaren Extraktionssuspension ist gelb und zeigt Absorptionsmaxima, wie sie für Karotine charakteristisch sind.
Aus den abzentrifugierten Partikeln läßt sich durch Waschen mit Wasser ebenfalls Chlorophyll in Lösung bringen; ein Zusatz dieser wäßrigen, chlorophyll- und karotinhaltigen Extrakte bringt die Aktivität der NADP-Reduktion nicht wieder zurück. Der Zusatz von 0,033% Triton zum Reaktionsgemisch steigert die Raten wiederum beträchtlich. Tab.13 zeigt einen Vergleich der Heptan-extrahierten Partikel mit den Äthanol-extrahierten Partikeln.

Tab.13: Der Einfluß von Triton auf die Photoreduktion von NADP mit heptan- und äthanolextrahierten, digitoninfragmentierten Chloroplasten
Als Donatorsystem diente Ascorbat/DCPIP, die Reaktionsdauer betrug 45 min.

		µMole $NADPH_2$ gebildet in 45 min. Licht
P200 Heptan ex.	(0,23 mg Chlorophyll) + -	0,5
	+ Plastocyanin (1 mµMol)	1,3
	" + 0,033% Triton	4,7
	" + 0,033% Triton + 1 ml Extrakte	4,6

		µMole $NADPH_2$ gebildet in 45 min. Licht
P200 Äth. ex.	+ -	0,7
	+ 0,033% Triton	0,65
	+ Plastocyanin (1 mµMol)	0,95
	+ 0,033% Triton + Plastocyanin (1 mµMol)	4,2
P200 Äth. ex.	+ Asc./DAD	0,1

Wie der Extraktionsversuch mit Äthanol zeigt, sind die Unterschiede der NADP-Reduktionsraten mit verschiedenen Donatoren im gleichen Verhältnis erhalten geblieben wie in den nichtextrahierten Partikeln, denn der DCPIP-"by pass" ist auch in äthanolextrahierten Partikeln zu messen und ist unabhängig von einer Detergenzzugabe.

Zusatz von Triton zu Photosyntheseversuchen mit P1s1 (= osmotisch aufgebrochene Chloroplasten)

Isolierte osmotisch aufgebrochene Chloroplasten zeigen keine Steigerung der photosynthetischen Aktivität nach Zusatz von Plastocyanin, da sie bereits gesättigt sind.
Um die Detergenzeinwirkungen auf partikuläre Systeme näher zu studieren, wurde ein Einfluß von Triton in der oben beschriebenen optimalen Konzentration auf P1s1 untersucht. Wie Vernon[29])

berichtete, hemmt Triton Photosynthese-Reaktionen mit "broken chloroplasts"; mit diesen Befunden konnte Übereinstimmung erzielt werden: Die Sauerstoffentwicklung und die ATP-Bildung sind durch diese Triton-Konzentration irreversibel zerstört worden, die NADP-Photoreduktion läßt sich jedoch durch Plastocyanin in Anwesenheit eines Elektronendonatorsystems wieder reaktivieren (Tab.14).

Tab.14: Der Einfluß von 0,033%iger Tritonlösung auf Photosynthese-Reaktionen in P1s1
(10 min. Licht, 0,2 mg Chlorophyll)

	µAtome O	µMole $NADPH_2$ gebildet	µMole ATP
P1s1, Asc., ADP, NADP,	4,3	4,4	4,5
+ Plastocyanin	4,2	4,7	5,2
+ 0,033% Triton	0,6	0,3	0,8
+Plastocyanin + 0,033% Triton	0,6	2,2	0,9
+ DAD	2,9	4,4	6,0
+ DAD + 0,033% Triton	0,4	0,8	0,8
+ DAD + 0,033% Triton + Plastocyanin	0,4	3,0	0,8

Den Gefäßen mit Tritonlösung wurde außerdem noch Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase zugesetzt.

B) Der Einfluß von Polyphenoloxidase auf Photosynthese-reaktionen in digitonin-fragmentierten Chloroplasten

In einigen Pflanzen, darunter Spinat, sind in der Lamellar-struktur der Chloroplasten Polyphenoloxidasen lokalisiert. Sie gehen durch osmotisches Aufbrechen der Chloroplasten nicht in den Extrakt. In den meisten Fällen sind die Polyphenol-oxidasen in der Struktur latent, d.h. man kann keine Oxidation von Diphenolen mit O_2 nachweisen. Bei der Behandlung der Chloroplasten mit Detergentien werden sie aus der Struktur herausgelöst und ihre Aktivität wird freigesetzt[30]. Das gilt z.B. für Chloroplasten aus Blättern von Spinat, Futterrüben, Rittersporn und Tomaten[31].
Es gibt aber auch Pflanzen, deren Chloroplasten überhaupt keine Phenoloxidasen enthalten, wie Primula malacoides, Primula obconica und Arum maculatum[31]. Andererseits gibt es auch Fälle, bei denen Polyphenoloxidasen sofort nach dem osmotischen Auf-brechen der Chloroplasten nachzuweisen sind, wobei dann eine Detergenzbehandlung keine Steigerung der Aktivität mehr ein-bringt[31]. Eine direkte Beteiligung der Phenoloxidasen am Photosynthesegeschehen als Enzyme oder Kofaktoren, wie schon einmal vermutet wurde[32], liegt wohl nicht vor, denn es konnte bisher keine phenoloxidase-abhängige Photosynthese-Reaktion gefunden werden. Außerdem zeigen Chloroplasten, die keine Phenoloxidasen enthalten, die gleichen Photosyntheseraten wie Spinatchloroplasten[31].
Es erschien nun interessant zu prüfen, ob diese endogenen Poly-phenoloxidasen oder eine aus Kartoffeln hergestellte Tyrosinase einen Einfluß auf Photosynthese-Reaktionen ausüben.

Die Verteilung und das Verhalten von Polyphenoloxidasen nach Digitoninfragmentierung von Spinatchloroplasten

Um zu untersuchen, wie sich die Polyphenoloxidase-Aktivität auf die einzelnen Fraktionen der unter A) beschriebenen Digitonin-fragmentierung verteilt, wurde mit den Partikeln P200 und mit den 3 Ammoniumsulfatfraktionen des Überstandes S200 die Sauer-stoffaufnahme mit einem o-Hydrochinon als Substrat gemessen.

Der grüne Überstand S20 der Digitoninfragmentierung von Spinatchloroplasten (0,2 ml) nahm in 10 min. Dunkelreaktion mit 5 µMolen Dopamin als Substrat 9 µMole O_2 auf (Tab.15).

Tab.15: Vergleich der Polyphenoloxidase-Aktivitäten in den verschiedenen Fraktionen der Auftrennung von S20

Partikel			Ammoniumsulfatfällung von S200		
S20	P200	P200 (gewaschen)	1.Fraktion	2.Fraktion	3.Fraktion
9	3,2	2,0	9,5	12	0,67

Die Hauptaktivität liegt in der 2. Fraktion der Ammoniumsulfatfällung des Überstandes S200, während die gewaschenen Partikel P200 und die 3. Fraktion, die Plastocyanin enthält, vergleichsweise geringe Aktivität haben. Dieser Befund war insofern von Bedeutung, als dadurch ein Zusammenhang mit dem eigenartigen Verhalten der NADP-Reduktionsraten mit dem Donatorpaar Asc./DCPIP bei der Anreicherung und Isolierung des Plastocyanins angedeutet wurde.

Die Reduktion von NADP mit Asc./DCPIP als Elektronendonator wurde in P200 durch Zugabe des Überstandes S200 oder seiner Acetonfällung gehemmt, ein Zusatz des daraus isolierten Plastocyanins brachte aber eine deutliche Stimulierung (siehe Tab.5 und 7). Diese Stimulierung durch Plastocyanin kann aber wieder unterdrückt werden, wenn außer Plastocyanin noch 0,2 ml der 2. Fraktion der Ammoniumsulfatfällung (entsprechend 12 µMolen O_2-Aufnahme in 10 min.) zugesetzt wurden (siehe Tab.16).

Tab. 16: Einfluß der Polyphenoloxidase (= 2. Fraktion der Ammoniumsulfatfällung von S200) auf die plastocyaninstimulierte NADP-Reduktion in P200 mit Asc./DCPIP als Elektronendonatoren (µMole $NADPH_2$ gebildet in 15 min.)

ohne Zusatz	+2.Fraktion der Ammoniumsulfatfällung	+Plastocyanin	+Plastocyanin +2.Fraktion
1,2	0,2	3,0	0,14

Wie aus der Tabelle 16 hervorgeht, hebt ein Zusatz der polyphenoloxidasehaltigen 2. Fraktion nicht nur die stimulierende Wirkung des Plastocyanins auf, sondern senkt auch die Werte der plastocyanin-unabhängigen NADP-Reduktion mit Asc./DCPIP allein. Zur Klärung des Mechanismus dieser Hemmwirkung wurde den Versuchen eine KCN-Menge zugesetzt, die Polyphenoloxidasen vollständig, Plastocyanin aber nur wenig hemmt (Tab.17).

Tab.17: NADP-Reduktion in P200 mit Asc./DCPIP als Elektronendonatorsystem: Hemmwirkung der Polyphenoloxidasen mit und ohne KCN.
Die Polyphenoloxidase wurde in einer Menge zugegeben, die einer Sauerstoffaufnahme von 12 µMolen in 10 min. entsprach (0,2 ml).

µMole $NADPH_2$ in 15 min.	ohne Zusatz	+Plastocyanin	+Plastocyanin +$5 \cdot 10^{-3}$ m KCN
P200 gewaschen	0,8	2,75	2,3
+0,2 ml 2.Fraktion	0,35	0,6	2,2

Die Aufhebung der Hemmwirkung der Polyphenoloxidasen durch KCN ist ein guter Hinweis dafür, daß die Hemmwirkung der 2. Ammoniumsulfatfraktion des Überstandes auf die NADP-Reduktion in P200 mit dem Donatorsystem Asc./DCPIP tatsächlich auf die Anwesenheit der Phenoloxidasen in dieser Fraktion, und nicht auf die Beteiligung einer anderen darin vorkommenden Substanz zurückzuführen ist. Eine Bestätigung dieser Annahme konnte mit einer Vergleichspräparation von P200 und S200 aus einer Digitonin-Fragmentierung von Primula malacoides erbracht werden. Der Überstand S200 zeigt in diesem Falle keine Polyphenoloxidaseaktivität, denn die O_2-Aufnahme mit Dopamin ist gleich Null. So wurde die NADP-Reduktion mit P200 aus Spinat und DCPIP als Donator vom Überstand S200 aus Primeln genau so stimuliert wie mit Plastocyanin. Mit Partikeln P200 aus Primeln läßt sich der gleiche Versuch durchführen (Tab.18).

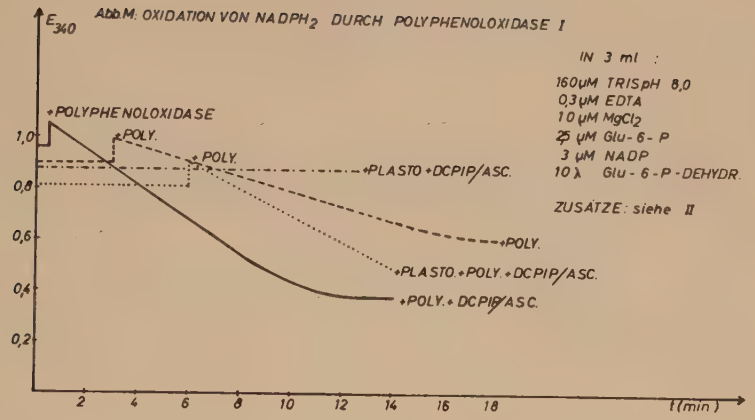
Tab.18: Stimulierung der NADP-Reduktion mit P200 aus Primeln und Spinat durch einen Polyphenoloxidase-freien Überstand S200 und durch Plastocyanin aus Primeln (DCPIP als Donator)

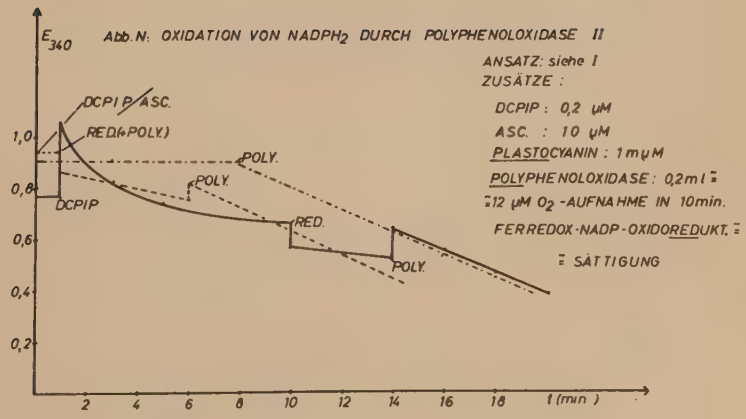
P200 (Spinat)	µMole $NADPH_2$ in 15 min.
-----	1,9
+ S200 = 0,4 mg Chlorophyll (Primel)	3,0
+ 1 mµMol Plastocyanin (Primel)	3,35
P200 (Primel)	
-----	1,55
+ S200 (Primel)	2,6
+ 1 mµMol Plastocyanin (Primel)	4,8

Die Polyphenoloxidasen sind Enzyme, die mit O_2 reagieren; die NADP-Reduktion wird jedoch unter Stickstoff durchgeführt. Dies legte die Vermutung nahe, daß der eigentliche Einfluß der Polyphenoloxidasen nicht auf der Hemmung der Photoreduktion von NADP beruht, sondern auf einer Oxidation des gebildeten NADP nach dem Öffnen der Reaktionsgefäße. Diese Annahme wird bestätigt durch folgende Versuche:
Läßt man ein Reaktionsgefäß nach der Belichtung sofort nach dem Öffnen in ein gleiches Volumen 10^{-3} m KCN-Lösung ausfließen, so kann man noch einen Teil des gebildeten $NADPH_2$ messen (1,25 µMole in 15 min.), während im Vergleichsgefäß ohne KCN kein $NADPH_2$ mehr vorhanden ist (0,12 µMole in 15 min.). Der Ablauf dieser Aufoxidation von $NADPH_2$ durch Phenoloxidasen an Luft wurde photometrisch untersucht.

Untersuchungen zum Mechanismus der Aufoxidation von $NADPH_2$ durch Polyphenoloxidasen

Aus NADP wurde über die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase mit Glucose-6-phosphat als Substrat $NADPH_2$ von bestimmter Extinktion hergestellt. Dieser Lösung in einer Küvette wurden dann in verschiedener Reihenfolge Polyphenoloxidase aus Chloroplasten, DCPIP, Plastocyanin, Asc./DCPIP und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase zugesetzt und die Veränderung der Extinktion bei 340 mµ beobachtet.


E340
Abb.M. OXIDATION VON NADPH2 DURCH POLYPHENOLOXIDASE I
IN 3 ml :
160µM TRIS pH 8,0
0,3µM EDTA
10µM MgCl2
25 µM Glu-6-P
3 µM NADP
10 λ Glu-6-P-DEHYDR.
ZUSÄTZE: siehe II
+POLYPHENOLOXIDASE
+POLY.
+POLY.
+PLASTO +DCPIP/ASC.
+POLY.
+PLASTO.+POLY.+DCPIP/ASC.
+POLY.+DCPIP/ASC.
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
2
4
6
8
10
12
14
16
18
t(min)


E340
Abb.N: OXIDATION VON NADPH2 DURCH POLYPHENOLOXIDASE II
ANSATZ: siehe I
ZUSÄTZE :
DCPIP : 0,2 µM
ASC. : 10 µM
PLASTOCYANIN : 1 mµM
POLYPHENOLOXIDASE : 0,2 ml ≙
≙12 µM O2 -AUFNAHME IN 10min.
FERREDOX-NADP-OXIDOREDUKT. ≙
≙ SÄTTIGUNG
DCPIP/ASC.
RED.(+POLY.)
POLY.
POLY.
DCPIP
RED.
POLY.
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
2
4
6
8
10
12
14
16
18
t (min)

Es konnten folgende Veränderungen festgestellt werden:

1. Werden der $NADPH_2$-Lösung Plastocyanin und Asc./DCPIP zugesetzt, so tritt kein Abfall der Extinktion ein.
2. Wird diesem Gemisch von $NADPH_2$, Plastocyanin und Asc./DCPIP Phenoloxidase zupipetteirt, so setzt ein rascher Extinktionsabfall ein (Abfall E = 0,100 in 2 min.).
3. Derselbe Effekt tritt ein, wenn das Plastocyanin weggelassen wird.
4. Setzt man der $NADPH_2$-Lösung Polyphenoloxidasen zu und läßt das DCPIP weg, so tritt ebenfalls ein Extinktionsabfall ein, allerdings nur mit der halben Steilheit im Vergleich zum Versuch mit DCPIP (Abfall E = 0,04 bis 0,06 in 2 min.).
5. Ein Zusatz von Reduktase bringt ohne Polyphenoloxidasen einen leichten Abfall (E = 0,04 in 2 min.), ein nachträglicher Zusatz von Polyphenoloxidasen erhöht den Abfall auf 0,1 in 2 min.
6. Wird eine Reihenfolge von: $NADPH_2$, Plastocyanin, DCPIP, Reduktase, Phenoloxidase gewählt, so ergibt sich folgender Kurvenverlauf:
   Steiler Anstieg bei der Zugabe von DCPIP, sodann Extinktionsabfall, der sich auf 0,02 pro 2 min. einstellt. Der Zusatz von Reduktase bringt kaum eine merkliche Erhöhung der Abfallsgeschwindigkeit, dagegen erfolgt beim Zusatz von Polyphenoloxidase eine Erhöhung der Abfallsgeschwindigkeit von 0,025 auf 0,1 in 2 min.

C) Der Einfluß von Polyphenoloxidase aus Chloroplasten, Tyrosinase aus Kartoffeln und Kupferionen auf Photosynthesereaktionen in intakten Chloroplasten (P1s1)

Nach einem Vergleich von Polyphenoloxidasegehalt und photosynthetischer Aktivität in den Chloroplasten zahlreicher Pflanzen schien ein Zusammenhang zwischen diesen zwei Aktivitäten zu bestehen[31], denn Chloroplasten mit einem hohen Polyphenoloxidasegehalt haben meist geringere photosynthetische Aktivität als solche, deren Polyphenoloxidasegehalt gering oder latent ist. Deshalb sollte der Einfluß von Tyrosinase und einer aus Chloroplasten isolierten Polyphenoloxidase auf die O_2-Entwicklung in der Hill-Reaktion mit Ferricyanid oder NADP und auf die offenkettige und zyklische Photophosphorylierung im Vergleich zum Einfluß von Kupferionen untersucht werden.

I. Der Einfluß von Kupferproteiden auf Photosynthesereaktionen in intakten Chloroplasten (P1s1)

Wie Tab.19 zeigt, wurden die in Spinatchloroplasten vorkommenden Kupferproteide, eine aus Kartoffeln hergestellte Tyrosinase und 100 γ $CuCl_2$, in den verschiedenen Photosynthesereaktionen untersucht.

Tab.19: Der Einfluß von Polyphenoloxidase, Plastocyanin, Tyrosinase und 100 γ $CuCl_2$ auf die O_2-Entwicklung und die offenkettige Photophosphorylierung in der Hill-Reaktion mit NADP und mit Ferricyanid in P1s1.

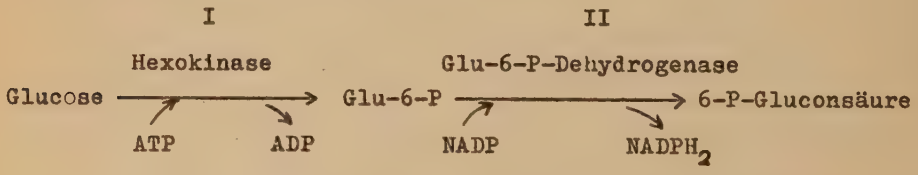
Zusätze zu ADP, Ascorbat und NADP:	µAtome O (in 15 min. Licht)	µMole $NADPH_2$	ATP
----	4,4	4,4	4,5
+ 1 mµMol Plastocyanin	4,3	4,7	5,2
+ Tyrosinase mit $0,7 \cdot 10^{-8}$ gA Cu	4,0	3,9	0,1
+ Phenoloxidase mit $1,2 \cdot 10^{-8}$ gA Cu	4,6	4,1	4,6
+ 100 γ $CuCl_2$	0,6	0,03	
Zusätze zu ADP, Ferricyanid:			
----	5,5		4,5
+ Tyrosinase (s.o.)	4,3		0,3

Ein Zusatz der in Chloroplasten vorkommenden Kupferproteide Polyphenoloxidase und Plastocyanin beeinflußt die offenkettige Phosphorylierung nicht. Die Tyrosinase aus Kartoffeln zeigt einen Entkoppelungseffekt, während der Elektronentransport, gemessen als $NADPH_2$-Bildung und als O_2-Entwicklung nicht beeinflußt wird. Der Einfluß von Kupferionen wird noch eingehender untersucht. Die Hemmung der ATP-Bildung durch die Tyrosinase ist nicht nur auf die offenkettige Phosphorylierung beschränkt, sondern gilt auch für die Photophosphorylierung mit Menadion als Kofaktor (Tab.20).

Tab.20: Der Einfluß von Polyphenoloxidase, Tyrosinase und Plastocyanin auf die zyklische Photophosphorylierung mit 0,3 µMolen Menadion als Kofaktor in P1s1.

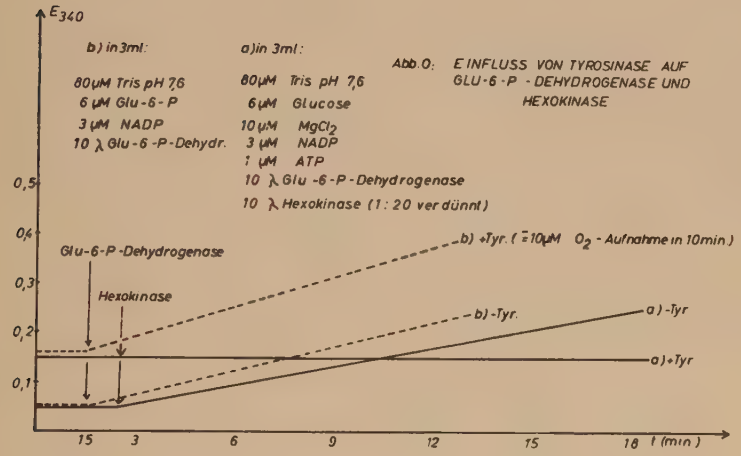
Zusätze zu ADP und Menadion	µMole ATP in 15 min. Licht gebildet
----	3,8
+ Tyrosinase mit $0{,}2 \cdot 10^{-8}$ gA Cu	0,2
+ Polyphenoloxidase mit $0{,}48 \cdot 10^{-8}$ gA Cu	3,65
+ 1 mµMol Plastocyanin	3,7

Da der Effekt der Tyrosinase in Chloroplasten auf die Phosphorylierung beschränkt bleibt und das Elektronentransportsystem nicht beeinträchtigt, wurde im gekoppelten Enzymtest geprüft, ob die Tyrosinase auf Kinasen allgemein einen Einfluß ausübt, oder nur spezifisch die Photophosphorylierung entkoppelt. Dazu wurde folgender Reaktionsweg benutzt:



Der Ablauf dieser Reaktionen kann bei 340 mµ ($NADPH_2$) photometrisch verfolgt werden. Die Reaktion II kann auch für sich untersucht werden, wenn als Substrat Glu-6-P eingesetzt wird.

Abb. O gibt den Reaktionsverlauf für I + II und II allein mit und ohne Zusatz von Tyrosinase an (a = I + II; b = II). Auch in dieser gekoppelten Reaktion wird spezifisch die Kinase gehemmt, die Glu-6-P-Dehydrogenase wird dagegen nicht beeinflußt.



II. Der Einfluß von Kupferionen auf Photosynthesereaktionen in intakten Chloroplasten (Pis1)

Im Gegensatz zum proteingebundenen Kupfer der Tyrosinase haben Cu^{2+}-Ionen erst bei relativ hohen Konzentrationen einen Einfluß auf Photosynthesereaktionen. Wie Tab. 21 zeigt, ist der Einfluß von Kupferionen auf die verschiedenen Photosynthesereaktionen nicht gleich.

Tab.21: Der Einfluß von Cu^{2+}-Ionen auf die O_2-Entwicklung in der Hill-Reaktion mit Ferricyanid und mit NADP und auf die offenkettige und zyklische Photophosphorylierung in P1s1.

$CuCl_2$-Zusätze (in γ)	µAtome O entwickelt	µMole in 15 min. $NADPH_2$ gebildet	Licht ATP
1. Hill-Reaktion mit Ferricyanid			
----	6,2		4,5
5	5,5		2,4
20	5,3		1,3
100	5,7		0,5
500	5,0		unter 0,1
1000	1,2		unter 0,1
2. Hill-Reaktion mit NADP			
--	4,2	4,5	
1	4,3	4,9	
2	4,4	4,7	
5	3,7	4,9	
10	0,7	0,7	
3. Zyklische Photophosphorylierung mit PMS als Kofaktor			
			6,4
5			6,3
10			3,2
20			0,7
100			unter 0,1
4. NO_2^--Reduktion mit µMolen NO_2^-			µMole NO_2^- reduziert
--	6,2		2,6
5	3,8		2,1
10	1,2		1,1

1. Die Sauerstoffentwicklung in der Hill-Reaktion mit Ferricyanid wird erst bei sehr hohen Kupferkonzentrationen gehemmt (1 mg/Gefäß), während die ATP-Bildung schon bei 5 γ pro Gefäß zu 50% entkoppelt ist.
2. In der Hill-Reaktion mit NADP wird die O_2-Entwicklung genau wie die $NADPH_2$-Bildung von 10 γ $CuCl_2$ zu 85% gehemmt.
3. Die ATP-Bildung in der zyklischen Photophosphorylierung mit PMS als Kofaktor wird mit 10 γ zu 50% gehemmt.
4. Die NO_2^--Reduktion zu NH_3 wird durch 10 γ $CuCl_2$ zu 80% gehemmt.

Diskussion

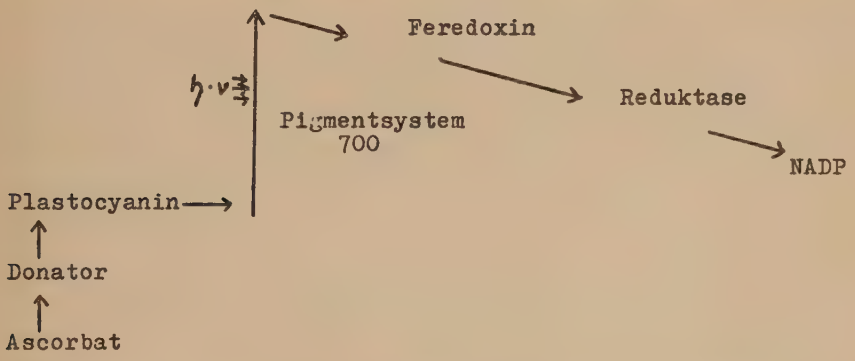
Chloroplasten aus höheren Pflanzen enthalten Kupfer[19,20]. Bisher wurden zwei Kupferproteide aus Chloroplasten beschrieben, die eine enzymatische Eigenschaft haben, eine Polyphenoloxidase und das Plastocyanin. Die Polyphenoloxidase ist in den Chloroplasten vieler Pflanzen (z.B. Spinat) latent und wird erst nach Behandlung der Chloroplasten mit Detergentien freigesetzt[30]. Manche Pflanzen, z.B. die Primel, enthalten in den Chloroplasten keine Polyphenoloxidase[31]. Man kann daraus schließen, daß die Polyphenoloxidasen keine obligatorische Rolle in der Photosynthese spielen. Im Gegensatz dazu steht das Plastocyanin. Mehrere Arbeitskreise haben ihm in der letzten Zeit eine spezifische Funktion im photosynthetischen Elektronentransport zugeschrieben. In dieser Arbeit wird ein enzymatisches Testsystem für das Plastocyanin aufgebaut, das zeigt, daß Plastocyanin obligatorisch für die photosynthetische NADP-Reduktion in bestimmten Chloroplastenpräparationen ist. Man kann aus dem bisher vorliegenden Untersuchungsmaterial schließen, daß Plastocyanin in der Photosynthese als electron carrier beteiligt ist. Bei einer Detergenzfragmentierung von Chloroplasten aus Spinat und anschließender Differentialzentrifugation ergibt sich eine charakteristische Kupferverteilung auf die einzelnen Fraktionen. Die bei 20 000 g abzentrifugierten Partikel (P20) enthalten (auf Chlorophyll bezogen) etwa noch soviel Cu wie die intakten Chloroplasten und sind noch im Stande, in einer Hill-Reaktion O_2 zu entwickeln, wenn auch nur mit der halben Reaktionsgeschwindigkeit wie intakte Chloroplasten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Partikelfraktion P20 mit nichtfragmentierten Chloroplasten verunreinigt ist.

Die bei 200 000 g abzentrifugierten Partikel P200 sind praktisch kupferfrei; sie entwickeln in einer Hill-Reaktion keinen O_2 mehr. Wie unten noch ausführlich diskutiert wird, sind die Partikel aber noch in der Lage, bei Belichtung NADP auf Kosten eines künstlichen Elektronendonators zu reduzieren, wenn Plastocyanin zugegeben wird.

Der Hauptteil des Kupfers der Chloroplasten wird durch die Detergenzbehandlung in Lösung gebracht und verteilt sich etwa zu 80% auf die endogene Polyphenoloxidase und zu 20% auf Plastocyanin.
Mit den Cu-freien Partikeln P200 konnte ein enzymatisches Testsystem für das Plastocyanin aufgebaut werden, denn sie reduzieren bei Belichtung NADP nur, wenn Ferredoxin, Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase und ein künstlicher Elektronendonator - und wenn Plastocyanin als Kofaktor zugesetzt wird.
In P200 liegt offensichtlich das Pigmentsystem I des photosynthetischen Elektronentransportes vor, das sowohl auf der Akzeptorseite mit Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase, als auch auf der Donorseite mit Plastocyanin vervollständigt werden muß, um eine photosynthetische NADP-Reduktion, allerdings nur mit künstlichem Elektronendonatorsystem zu ermöglichen.
Die Lichtreaktion II ist entweder abgetrennt oder inaktiviert worden, so daß keine O_2-Entwicklung mehr durch die Photooxidation des Wassers möglich ist. Da Ferredoxin und die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase heute leicht zugänglich sind, sind die digitoninfragmentierten Partikel ein Testsystem für Plastocyanin, obwohl natürlich auch Ferredoxin und die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase mit dem gleichen System getestet werden können. Der Plastocyanintest ist sehr empfindlich, denn es sind nur 1 mµMol Plastocyanin zur Sättigung nötig.
Diese NADP-Reduktion kann durch KCN oder Salicylaldoxim gehemmt werden. KCN ist ein Hemmstoff für kupferhaltige Enzyme. Seine Hemmwirkung im Testsystem für Plastocyanin ist deshalb wahrscheinlich auf eine Komplexierung des proteingebundenen Kupfers im Plastocyanin zurückzuführen. Im Gegensatz zu anderen kupferhaltigen Enzymen wird Plastocyanin erst bei relativ hohen KCN-Konzentrationen (10^{-2}_{m}) gehemmt.
Salicylaldoxim ist ein spezifischer Kupferkomplexbildner. Er hemmt alle Hill-Reaktionen in isolierten Chloroplasten. Seine Hemmstelle in intakten Chloroplasten wurde mit dem Plastocyanin in Zusammenhang gebracht. Neuerdings geht aber aus Berichten hervor[6], daß die Hemmstelle des Salicylaldoxims in intakten Chloroplasten nicht das Plastocyanin, sondern einen anderen Faktor vor der 1. Lichtreaktion betreffen muß, denn die Salicylald-

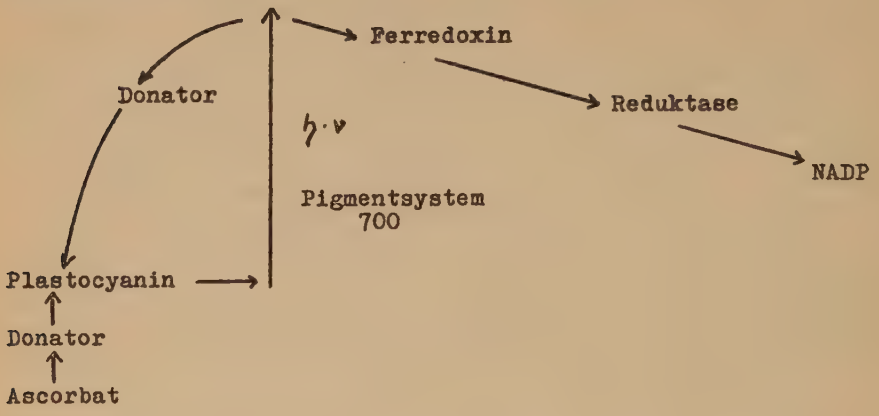
oxim-Hemmung konnte durch DCPIP , DAD und TMPD als Elektronendonatoren wieder aufgehoben werden. Dieser Befund gilt nicht für das hier beschriebene Plastocyanin-Testsystem mit digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200). Nur im Falle des DCPIP als Elektronendonator ist die NADP-Reduktion teilweise salicylaldoxim-unempfindlich und wird weiter unten noch eingehender diskutiert.
Die NADP-Reduktionsraten sind von dem angebotenen Elektronendonatorsystem abhängig. Dabei wird der eigentliche Donator nur in katalytischen Mengen zugesetzt und von einem Überschuß Ascorbat reduziert gehalten.
Für die Abhängigkeit der photosynthetischen NADP-Reduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten von Kofaktoren ergibt sich folgendes Schema:

Schema des Elektronentransportes im Plastocyanin-Testsystem

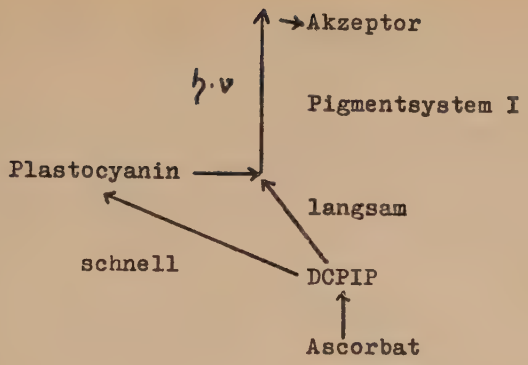


Gibt man den Donator in einer überoptimalen Konzentration zu diesem Testsystem, so sinkt die Rate der NADP-Reduktion. Dieser Abfall der NADP-Reduktionsrate kann so gedeutet werden, daß ein Teil der gerade oxidierten Menge des Donators als Akzeptor für das Pigmentsystem I dienen kann und in einem zyklischen Prozeß die Elektronen wieder auf Plastocyanon überträgt.

Schema des Elektronentransportes bei überoptimaler Donatorkonzentration



Einen Sonderfall unter den verwendeten Donatoren stellt das DCPIP dar. Mit dem Donatorsystem Asc./DCPIP, Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase können die bei 200 000 g abzentrifugierten Partikel (P200) auch ohne Plastocyanin mit geringeren Raten (etwa 25% des Wertes mit Plastocyanin) NADP im Licht reduzieren. Damit steht in Übereinstimmung, daß diese Plastocyanin-unabhängige Reduktion, im Gegensatz zur Stimulierungsrate durch Plastocyanin, nicht durch KCN oder Salicylaldoxim gehemmt werden kann.
Dieses Verhalten kann interpretiert werden als "by pass" des Plastocyanins. Anscheinend kann das DCPIP unter Umgehung des Plastocyanins zu einem gewissen Betrag auch Elektronen direkt an das Pigmentsystem I abgeben. Durch die Zugabe von Plastocyanin wird diese Reaktion allerdings stark beschleunigt. Diese Ergebnisse bestätigen und erklären auch ältere Befunde mit dem Donator DCPIP in digitonin-fragmentierten Chloroplasten[25].
Ein Schema zeigt die Möglichkeiten für das DCPIP als Elektronendonator:

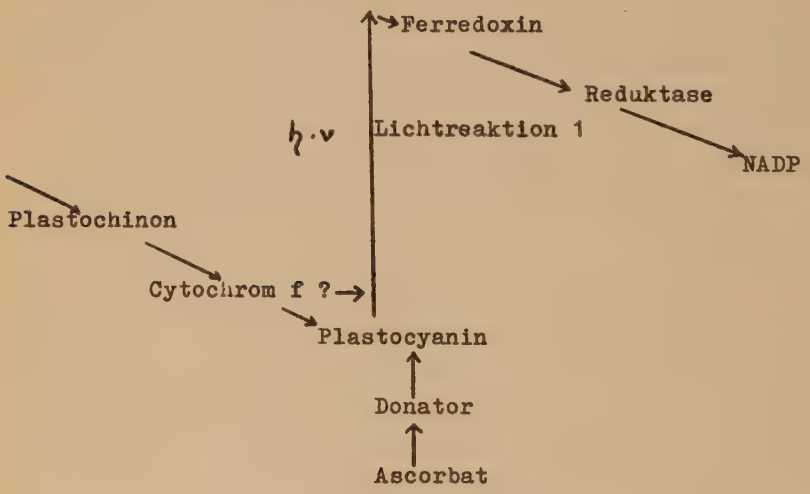


Untersuchungen über die Stellung des Cytochrom f im Elektronentransportsystem

Mit dem Testsystem für Plastocyanin wurde versucht, über die Stellung des Cytochrom f eine Aussage zu machen. Die Diskussion über die Einordnung des Cytochrom f in die Elektronentransportkette der Chloroplasten ist in letzter Zeit erneut im Gang. Die erste Einordnung gelang Witt[33] und Duysens[34], die Cytochrom f als Donator für die 1. Lichtreaktion beschrieben. Chance[35] folgerte aus der Temperatur-Unabhängigkeit dieser Reaktion, daß das Cytochrom f eng und unmittelbar mit dem Pigmentsystem I verknüpft sein müsse.
Kok et al.[17] fanden aber, daß Cytochrom f nicht der einzige Donator für die 1. Lichtreaktion zu sein scheint und kamen zu der Vorstellung, daß Cytochrom f und Plastocyanin parallel als Donatoren für das Pigmentsystem I in Frage kommen. Neuerdings kam Levin[36,37] durch Mutantenversuche sogar zu der Auffassung, daß das Cytochrom f vor dem Plastocyanin stehen müsse und der Donator für die 1. Lichtreaktion nur das Plastocyanin sei.
Die Digitonin-Fragmentierung bringt zumindest einen Teil des Cytochrom f der Chloroplasten ebenfalls in Lösung. Da aber nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die zurückbleibende Menge an Cytochrom f das System noch sättigt, wurden die digitonin-fragmentierten Chloroplasten P200 mit ammoniakalischem Äthanol extrahiert. Dem liegt zugrunde, daß durch Äthanolextraktion Cytochrom f aus Blattmaterial hergestellt wird. Nach Forti[28] hat das Cytochrom f eine hohe Katalase-Aktivität. Diese Katalase-Aktivität

nahm in P200 nach der Äthanol-Extraktion ab. Man konnte deshalb annehmen, daß entsprechend der Abnahme der Katalase-Aktivität Cytochrom f aus den Partikeln extrahiert wurde.
In den extrahierten Partikeln bleibt aber die NADP-Reduktion weiterhin nur vom Plastocyanin abhängig, während ein Zusatz von Cytochrom f keine weitere Stimulierung der NADP-Reduktionsraten mehr bringt.
Eine Aussage über die genaue Stellung des Cytochrom f im Elektronentransportsystem kann mit unserm Testsystem nicht gemacht werden. Man kann nur folgern, daß in digitonin-fragmentierten Chloroplasten das Plastocyanin der einzig mögliche Donor für das Pigmentsystem I zu sein scheint.

Ein Schema zeigt die Möglichkeiten der Anordnung der Donatoren für die 1. Lichtreaktion.



Diese Reihenfolge bestätigte kürzlich Wessels[30], der mit Plastocyanin- und Cytochrom f-freien Partikeln nach Detergenzfragmentierung eine Stimulierung der NADP-Reduktionsraten allein durch Plastocyanin erhielt, während ein Cytochrom f-Zusatz ohne Einfluß blieb.

Extraktion digitonin-fragmentierter Chloroplasten mit lipophilen Lösungsmitteln

Durch Behandlung von digitonin-fragmentierten Partikeln (P200) mit lipophilen Lösungsmitteln treten folgende Veränderungen auf:

1. Die Partikel sedimentieren schon bei 20 000 g
2. Es werden chlorophyll- und karotinhaltige Verbindungen extrahiert
3. Die NADP-Reduktion wird vom Zusatz geringer Mengen eines Detergenz abhängig.

Die Abhängigkeit der NADP-Reduktion von Detergenz-Zusatz erscheint zunächst überraschend. Der Befund läßt sich deuten, wenn man annimmt, daß die Differentialzentrifugation der Partikel nach der Digitonin-Fragmentierung nur den Überschuß an Detergenz entfernt. Die Partikel sind aber weiterhin in einem Mizell aus dem Detergenz fixiert. Dafür spricht, daß die Partikel auch nach dem Waschen nur bei 200 000 g abzentrifugierbar sind. Das lipophile Lösungsmittel zerstört das Mizell und entfernt den Rest des Detergenz. Die Partikel sind jetzt bei 20 000 g zentrifugierbar. Hat aber erst die Detergenzbehandlung dem Plastocyanin den Austritt aus der Struktur der Chloroplasten erlaubt, so sagt der Versuch mit den lipophil behandelten, fragmentierten Partikeln, daß auch der Eintritt des Plastocyanin in die Struktur von Detergenz abhängig ist. Die Behandlung mit Heptan hat die Struktur der fragmentierten Partikel so verschlossen, daß die ursprüngliche Konformation wie in intakten Chloroplasten wieder hergestellt wurde, aber mit dem Unterschied, daß das Plastocyanin aus seinem Funktionsort entfernt wurde. Um dem Plastocyanin jetzt wieder Eintritt in die Struktur zu verschaffen, wenn es dem Versuch zugesetzt wird, ist ein Zusatz von Detergenz notwendig.
Auf Grund dieses Verhaltens von Chloroplasten wurde versucht, ein noch einfacheres Testsystem für das Plastocyanin aufzubauen.

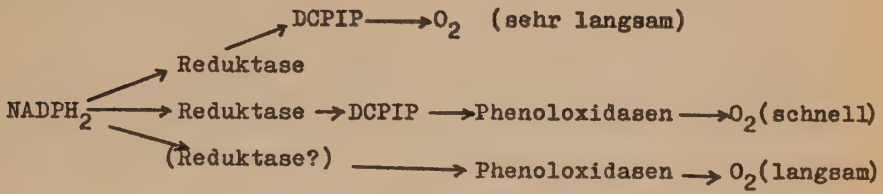
In intakten Chloroplasten ist keine Stimulierung der NADP-Reduktionsraten nach Zusatz von Plastocyanin zu messen, denn das Plastocyanin ist in den Chloroplasten in sättigender Menge vornanden.
Es war bekannt, daß Triton neben einer irreversiblen Inaktivierung der 2. Lichtreaktion einen scheinbaren Hemmeffekt auf den

Elektronentransport ausübt[31]. Das läßt sich folgendermaßen erklären:
Der Detergenzzusatz setzt Plastocyanin aus seiner Struktur frei; das kommt einer Verdünnung gleich und der Elektronentransport läuft mit verminderter Geschwindigkeit ab. Ein Zusatz von Plastocyanin bewirkt nun eine Stimulierung der NADP-Reduktionsraten , indem die Sättigungskonzentration für das Testsystem wiederhergestellt ist.
Werden nun diese detergenz-fragmentierten Chloroplasten mit Äthanol behandelt, so wird das Detergenz aus den Partikeln entfernt und damit wieder ein Schließen der Struktur bewirkt, die aber, im Gegensatz zu den intakten Chloroplasten, im Inneren kein Plastocyanin mehr enthalten.
Ein Plastocyaninzusatz zu diesen extrahierten Partikeln ist ohne Einfluß.Der "by-pass" der Elektronen vom DCPIP kann aber auch in den extrahierten Chloroplasten (ohne Detergenzzusatz) gemessen werden. Im Gegensatz dazu kann das große Molekül des Plastocyanins seine Stellung im Elektronentransportsystem erst nach Wiederöffnung der Struktur durch Detergenz einnehmen und so wiederum die NADP-Reduktion stimulieren.

Der Einfluß von Polyphenoloxidasen, Tyrosinase und Kupferionen auf Photosynthesereaktionen in isolierten Chloroplasten

I. Beim Aufbau des Testsystems für das Plastocyanin brachten endogene Polyphenoloxidasen mit DCPIP als Elektronendonator methodische Schwierigkeiten. Es zeigte sich, daß zwar die NADP-Reduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten (P200) mit DCPIP als Donator durch gereinigtes Plastocyanin stimuliert wird. Setzt man aber anstelle von Plastocyanin den Überstand der Ultrazentrifugation bei 200 000 g zu, aus dem das Plastocyanin gewonnen wurde, so läßt sich kein $NADPH_2$nachweisen; den gleichen Effekt kann man erzielen, wenn man dem Versuch zum Plastocyanin noch Polyphenoloxidasen aus Spinatchloroplasten zusetzt. Diese Hemmwirkung wurde als Rückoxidation des gebildeten $NADPH_2$ bei Luftzutritt durch die Polyphenoloxidasen erklärt. Diese Reoxidation von $NADPH_2$ durch Polyphenoloxidase wurde durch photometrische Untersuchung bestätigt, denn es ergab sich, daß $NADPH_2$ durch DCPIP

und die Polyphenoloxidasen aus Spinat schnell autoxidiert wird. Daraus läßt sich folgendes Schema des Mechanismus der Autoxidation von $NADPH_2$ an Luft unter dem Einfluß von Polyphenoloxidasen aufstellen:



Die Reaktion $NADPH_2$ → Reduktase → DCPIP → Polyphenoloxidase → O_2 läuft schnell ab. Man könnte DCPIP als Kofaktor der Oxidation von $NADPH_2$ durch Polyphenoloxidasen in Luft betrachten, denn die Reaktion läuft ohne diesen Kofaktor entsprechend langsamer ab. Plastocyanin ist auf diese Reaktion ohne Einfluß. Es ist anzunehmen, daß zwischen DCPIP und $NADPH_2$ eine enzymatische Reaktion, katalysiert durch Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase, die nach San Pietro[36] eine Diaphorase-Eigenschaft hat, abläuft.

II. Die Versuche zur Fragestellung, ob Plastocyanin Polyphenoloxidasen oder Tyrosinase in intakten Chloroplasten einen Einfluß auf Photosynthese-Reaktionen ausüben, ergaben, daß nur die Tyrosinase bestimmte Reaktionen hemmt. Es stellte sich heraus, daß die Tyrosinase die zyklische und die offenkettige Photophosphorylierung entkoppelt, während der Elektronentransport unbeeinflußt bleibt. Diese Eigenschaften haben die Polyphenoloxidasen aus Chloroplasten nicht. Über die Ursache der Hemmwirkung auf die ATP-Bildung läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen keine weitere Aussage machen. Die Entkoppelung beruht vermutlich auf der Blockierung einer Kinase, denn es zeigte sich, daß auch die Hexokinase durch die Tyrosinase gehemmt wird. Daß Tyrosinase Enzyme durch Oxidation des Tyrosins zu inaktivieren vermag, ist bekannt[38]. Überraschend ist deshalb der spezifische Einfluß der Tyrosinase auf das Photosynthesesystem.
Bei der Untersuchung des Einflusses von Kupferionen auf Photosynthese-Reaktionen zeigte sich, daß die Sauerstoffentwicklung

in der Hill-Reaktion mit Ferricyanid relativ unempfindlich selbst gegenüber 500 γ $CuCl_2$ ist, während die Hill-Reaktion mit NADP als Akzeptor schon von 10 γ zu 75% gehemmt wird. Die photosynthetische NO_2^--Reduktion wird von 10 γ $CuCl_2$ zu 80% gehemmt, eine hohe Empfindlichkeit zeigen auch die Photophosphorylierungen. Damit zeigen Kupferionen ebenfalls eine spezifische Hemmwirkung.

Die Hemmung der Hill-Reaktion mit NADP und NO_2^- als Akzeptor, im Gegensatz zu der mit Ferricyanid, konnte als spezifische Hemmung eines Faktors nach der 1. Lichtreaktion interpretiert werden, etwa als Antagonist des Ferredoxins.

Methodik

1. Die Herstellung von Chloroplastenfragmenten nach Arnon[40)]

Gewaschene Spinatblätter, von denen die Mittelrippen entfernt waren, wurden in 0,35 m NaCl-Lösung und 10% 0,2 m Tris pH 8 zerrieben, die ganzen Chloroplasten bei 1500 g abzentrifugiert, sodann in Wasser aufgebrochen und die entstandenen Bruchstücke hochtourig abzentrifugiert. Die so erhaltenen Chloroplastenfragmente (P1s1) wurden in Wasser aufgenommen und der Chlorophyllgehalt photometrisch bei 654 mμ bestimmt.

2. Detergenzfragmentierung nach Nieman u. Vennesland[21)] (geändert)

Zur Detergenzfragmentierung wurde die Chloroplastenherstellung vereinfacht: Spinatblätter wurden mit Sand, Wasser und 10% Tris pH 8 zerrieben, die grüne Suspension bei 1000 g vom Sand abgetrennt und die Chloroplastenpartikel bei 40 000 g abzentrifugiert. Nach dem Aufnehmen in 0,02 m Tris pH 8 wurde das Chlorophyll bestimmt (aus 500 g Spinat wurden etwa 150 mg erhalten) und erneut hochtourig abzentrifugiert. Die Chloroplastenpartikel wurden mit einer 0,05 m Tris-Lösung aufgenommen, die 1% Digitonin enthielt, und zwar (wenn nicht anders beschrieben) mit 1 ml dieser Lösung pro mg Chlorophyll in den abzentrifugierten Chloroplastenpartikeln.
Das Inkubationsgemisch stand eine Std. im Kühlschrank bei +4°C. Anschließend wurde 20 min. bei 20 000 g abgeschleudert. Die abgesetzten Partikel, P20 genannt, wurden in 0,05 m Tris pH 8 aufgenommen und in Eis aufbewahrt. Der grüne Überstand (= Pseudolösung), S20 genannt, wurde 1 Std. bei 200 000 g (oder 3 Std. bei 150 000 g) und 5°C abzentrifugiert.
Die abgesetzten Partikel, P200, wurden ebenfalls in 0,05 m Tris pH 8 aufgenommen und bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Der Überstand S200 war gelb und diente als Rohextrakt zur Herstellung von Plastocyanin, Polyphenoloxidase und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase.

3. Gefriertrocknung

Die Partikel P200, mit einem Chlorophyllgehalt von 5-6 mg/ml wurden vor der Äthanol- und Heptanextraktion lyophilisiert. Dazu wurden 5 ml P200-Suspension in einem Rundkolben mit 5% Saccharose im Methanolbad bei -40°C eingefroren und (in Eis gebettet) 4-6 Stdn. an einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert, nach der Trocknung im Exsikkator bei +4°C aufbewahrt.

4. Äthanol- und Heptanextraktion

Zur Extraktion mit Äthanol wurde zu Partikeln P200 oder zu intakten Chloroplasten P1s1 von bekanntem Chlorophyllgehalt 50% eiskaltes Äthanol zugetropft. Der ganze Vorgang geschieht bei Eiskühlung. Dann wurde 5 min. stehen gelassen (Eiskühlung) und anschließend bei 20 000 g abzentrifugiert. Der grüne äthanolische Überstand wird verworfen. Die abgesetzten Partikel werden 2-3 mal mit Wasser nachgewaschen (= in Wasser aufnehmen und wieder bei 20 000 g abzentrifugieren). Die Waschextrakte sind ebenfalls grün. Die so gewonnenen Partikel werden als P200 Äth. ex. oder als P1s1 Äth. ex. bezeichnet.
Wird die Äthanolbehandlung mit P200 Äth. ex. wiederholt, so läßt sich durch anschließendes Waschen mit Wasser ein grün-rot opalisierender Extrakt gewinnen. Aus diesem kann auf einer (mit 0,005 m Tris pH 8 vorbehandelten)DEAE-Zellulose-Säule mit 0,1% Tritonlösung eine grüne Fraktion mit Chlorophyllspektrum und mit 0,8 m Cl^- eine orangerote Fraktion mit Karotinspektrum abgetrennt werden.
Die Extraktion mit Heptan wurde mit lyophilisierten Partikeln P200 bei 20°C ausgeführt. Dazu wurde zu 100 mg P200-Trockenpulver 6-8 ml n-Heptan gegossen und 3 Stdn. auf einer Schüttelmaschine extrahiert. Die extrahierten Partikel werden hochtourig abgeschleudert, der gelbe Heptan-Überstand, der ein Karotinspektrum zeigt, wird verworfen.
Die abgesetzten Partikel werden 2-3 mal mit Wasser nachgewaschen, wobei ebenfalls grüne Extrakte entstehen. Die gewaschenen Partikel werden als P200 Hept. ex. bezeichnet.

5. Spektren, Photometrie, ATP-Bestimmung

Die in den Abbildungen gezeigten Spektren wurden mit einem Beckmann Spektralphotometer bei 4-facher Laufgeschwindigkeit mit Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke aufgenommen.
$NADPH_2$ wurde in den hochtourig abzentrifugierten Proben vor und nach Zugabe von 2 Tropfen HCl (2 n) anhand des entstehenden Extinktionsunterschiedes bei 340 mμ bestimmt.
H_2O_2 wurde durch die Reaktion mit Titanylsulfat bei 395 mμ bestimmt. ATP wurde nach Axelrod mit Phosphoglycerinsäure, $NADPH_2$, Phosphotriosedehydrogenase und Glyceratkinase durch den $NADPH_2$-Abfall bei 340 mμ, der der ATP-Menge proportional ist, gemessen.
Jede Kuvette enthielt: 160 μMol Tris PH 8, 5 μMol $MgCl_2$, 0,5 μMol $NADPH_2$, 10 μMol Phosphoglycerinsäure, 20 μMol Cystein, 0,1 ml der von den Chloroplasten (nach Zusatz von 0,2 ml 20%iger Trichloressigsäure) abzentrifugierten Reaktionslösung, in 3 ml Gesamtvolumen.

ATP-Bestimmung mit radioaktivem P^{32} nach Sugino und Miyoshi[41]

In den Versuchen zur Hemmwirkung der Tyrosinase auf die ATP-Bildung wurde radioaktives P^{32} eingesetzt und das in ATP eingebaute P^{32} bestimmt, indem das übriggebliebene P^{32} aus den Proben mit Ammoniummolybdat ausgefällt und ein Aliquot des Überstandes mit einem Endfensterzählrohr gezählt wurde.
Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren:
1 ml des Ansatzes wurde aus dem Probegefäß entnommen, zentrifugiert und mit 1 ml Wasser verdünnt. Diese 2 ml wurden mit 0,7 ml Fällungsreagenz (= 0,2 ml 1 n $HClO_4$, 0,1 ml 0,08 m Ammoniummolybdat und 0,05 ml Triäthylammoniumchlorid mit 55 mg/2 ml) versetzt und abzentrifugiert.
1,5 ml Überstand dieser Fällung werden mit 0,2 ml 2 n NH_4OH versetzt, von dem Gemisch 0,5 ml auf Aluminiumblättchen aufgetragen und im Endfensterzählrohr 2 mal 5 min. gezählt.

6. Kupferbestimmungen[42)]

Die Kupferbestimmungen in den Fraktionen unserer Aufarbeitung wurden nach einer von Sandell angegebenen Methode ausgeführt. Dazu wurden 1 bis 5 ml der Probe in einem Kjeldahl-Kölbchen mit 5 ml konz. HNO_3 und 2 ml konz. H_2SO_4 verascht. Beim Auftreten weißer Dämpfe wurden 2-3 ml Wasser zugesetzt und wieder bis zum Entstehen weißer Dämpfe eingeengt. Anschließend wurden 5 ml Wasser zugesetzt und gekocht.
Diese schwach gelbe bis farblose Lösung wurde auf 30 ml aufgefüllt, 2,5 ml EDTA (125 g EDTA in 100 ml konz. NH_3 in 500 ml gesamt) und 3 Tropfen Phenolphthaleinlösung zugesetzt und mit NH_3 unter Eiskühlung neutralisiert. In einem Schütteltrichter wird diese rosarote Lösung mit 1,25 ml 1%iger Na-diäthyldithiocarbaminat-Lösung und genau 5 ml Tetrachlorkohlenstoff 2 min. kräftig geschüttelt. Der in CCL_4 gelöste Kupfer-Carbaminat-Komplex wird von der wäßrigen Phase abgetrennt und die Extinktion eines Aliquots photometrisch bei 435 mμ mit einer Eichkurve (mit $CuCl_2$ von 1 bis 1000 γ) verglichen. Da die zur Neutralisation verwendete NH_3-Lösung (Merck) nicht ganz kupferfrei war, wurde kupferfreies NH_3 hergestellt, indem gasförmiges NH_3 aus einer Stahlflasche durch 5%ige Na-diäthyldithiocarbaminat-Lösung geleitet und anschließend in einer Eisfalle abgefangen wurde.

7. Herstellung der verwendeten Enzyme und Kofaktoren

a) Ferredoxin[43)] und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase[44)]

Beide Proteine können im gleichen Arbeitsgang aus Spinat erhalten werden. Dazu werden Spinatblätter ohne Mittelrippen 2 min. mit der 5-fachen Menge kaltem Wasser und mit 10% 0,2 m Tris pH 8 im Multimix bei +2°C zerschlagen und der Brei durch Verbandmull abgepreßt.
Dem grünen Preßsaft werden 35% an eiskaltem Aceton zugetropft, der Niederschlag wird 5 min. bei 1000 g abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird bis 70% Aceton weitergefällt und dieser Niederschlag in 0,05 m Tris pH 8 aufgenommen und dialysiert. Nach der Dialyse wird die Trübung abzentrifugiert, die

klare braune Lösung auf eine Konzentration von 0,2 m an Cl^- gebracht und auf eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben, die mit 0,2 m Cl^--Lösung vorbehandelt war. Im oberen Teil der 10 cm langen und 4 cm dicken Säule chromatographiert eine braune Zone, während eine gelbe Lösung durchläuft.
Die braune Zone wird mit 0,8 m Cl^--Lösung ausgewaschen, dialysiert und 2 mal rechromatographiert. Diese so gewonnene braune Lösung enthält Ferredoxin angereichert, das in einer Hill-Reaktion mit NADP auf seine Sättigungskonzentration geprüft wird.

Der gelbe Durchlauf enthält die Reduktase, welche durch 2 malige Chromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule (Kapazität 0,48), die mit 0,03 m Tris-HCl pH 7,3 vorbehandelt ist und mit 0,2 m Cl^- ausgewaschen wird, angereichert werden kann.
Die Ermittlung der im Versuch sättigenden Menge der erhaltenen Lösung geschieht mit gealterten Chloroplasten, sätt. Mengen Ferredoxin und einem künstlichen Elektronendonator.

b) Plastocyanin, Reduktase und Phenoloxidase aus S200

Das Plastocyanin wurde aus dem Überstand S200 nach Katoh angereichert. Dazu wurde dem Überstand bis 80% Aceton von $-15^{\circ}C$ zugetropft, der Niederschlag 2 min. bei 5000 g zentrifugiert, in 0,05 m Tris pH 8 aufgenommen und dialysiert. Nach der Dialyse wird die Trübung auszentrifugiert und bis 0,35 Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt. Die Fällung von 0,35 bis 0,75 Sättigung an Ammoniumsulfat wurde als 2. Fraktion, die von 0,75 bis 1,0 Sättigung als 3. Fraktion bezeichnet. Die 2. Fraktion wurde nach der Dialyse auf eine DEAE-Cellulose-Säule (mit 0,03 m Tris-HCl pH 7,3 vorbehandelt) gegeben und mit 0,2 m Cl^--Lösung ausgewaschen. Das Dialysat dieser gelben Lösung hatte Polyphenoloxidase- und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase-Eigenschaften.
Der 3. Fraktion wurden 2-3 Tropfen einer 2 m K-Ferricyanid-Lösung zugesetzt, wobei die Lösung eine blaue Farbe annahm. Diese blaue Lösung wurde auf eine DEAE-Säule (vorbehandelt mit 0,02 m Phosphat pH 7,0) gegeben und mit 0,3 m Phosphat pH 7,0 ausgewaschen. Nach Wiederholung der Säulenbehandlung und Dialyse ergaben sich die gezeigten Spektren (Abb.A).

c) Tyrosinase aus Kartoffeln[45)]

Zwei Kartoffeln wurden etwa 1 cm dick geschält und die Rinde im Multimix mit 150 ml Wasser 2 min. zerschlagen. Anschließend wurde abgeseiht und bei 5000 g abzentrifugiert: das ergab rund 175 ml dunkelbraune Lösung.
Dieser Lösung wurden 116 ml eiskaltes Aceton bis 40% Sättigung zugegossen, der Niederschlag abzentrifugiert und verworfen. Dem Überstand von 290 ml wurden 100 ml eiskaltes Aceton bis 55% Sättigung zugegossen. Der Niederschlag, der das Enzym enthielt, wurde in 30 ml Wasser aufgenommen, wobei sich praktisch kein Rückstand ergab. Die 32 ml brauner Lösung wurden mit Ammoniumsulfat bis 42% Sättigung gefällt und der Niederschlag verworfen. Die Fällung von 42% bis 68% wird in 8 ml Wasser aufgenommen und dialysiert.
Mit der so erhaltenen Lösung wurden in 10 min. Dunkelreaktion mit 20 µMolen Dopamin als Substrat 6,6 µMol O_2 pro 0,2 ml Enzymlösung aufgenommen.

d) Cytochrom f-Präparation aus Spinat[26)]

2250 g feuchte, vorgekühlte Spinatblätter werden mit 1500 ml eiskaltem Äthanol, 22 ml konz. NH_3 und 15 ml Triton X-100 in einem Braun Multimix portionsweise zerschlagen und durch eine Doppellage Verbandmull gepreßt. In die erhaltenen 2000 ml gelben Extrakt werden 2200 ml eiskaltes Aceton zugetropft, dann 1/2 Stunde bei 0° stehengelassen, dekantiert und der Niederschlag schnell durch eine Lage von etwa 1/2 cm Kieselgur Merck auf einem "Riesen"-Büchnertrichter (Ø 20 cm) abgesaugt.
Die Kieselgurschicht wird dann erst mit 66% $(NH_4)_2SO_4$-Lösung, dann mit 50% $(NH_4)_2SO_4$-Lösung nachgewaschen.
Eluiert wird die Kieselgurschicht dann mit 0,06 m Phosphat pH 8,0, wobei erst aufgefangen wird, wenn rote Tropfen durchkommen. Die erhaltenen 100 ml werden gegen $2 \cdot 10^{-4}$ m Ammoniumcarbamat-Lösung über Nacht dialysiert.

Anschließend Chromatographie an einer DEAE-Säule (Serva, Kapazität 0,48): ∅ 1 cm, Länge der Füllung in der Säule: 2-3 cm. Vorbehandlung der Säule: 0,002 m Phosphat pH 8,0.
Der gelbe Durchlauf nach Aufsetzen des dialysierten Extraktes wird verworfen. Beim Waschen der Säule mit 0,4 m Phosphat pH 8,0 bildet sich eine rote Zone, die nach unten abwandert. Das Eluat zeigt eine α-Bande (554 mμ) und eine γ-Bande bei 420 mμ. Die Lösung wird dann mit Ammonsulfat fraktioniert.
Der Niederschlag bei 0,25-0,45% Sättigung wird in 0,05 m Trispuffer pH 8,0 aufgenommen und gegen 0,005 m Trispuffer pH 8,0 dialysiert. Zusätzlich zum α- und γ-Peak tritt jetzt der β-Peak bei 521 mμ auf.
Wird dieses Dialysat auf DEAE wie oben rechromatographiert, so ergibt sich das Cytochrom f-Spektrum (allerdings nicht so schön wie das von Hill und Davenport aus Petersilie gewonnene!), Weitere Behandlung bringt keine weitergehende Reinigung, sondern schadet eher.

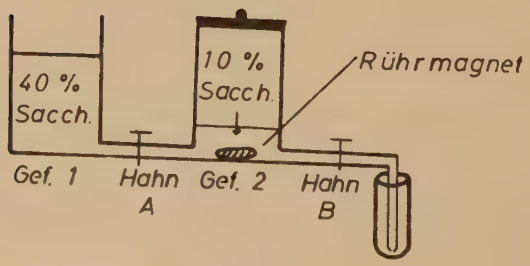
8. Ausführung der Versuche im Warburg-Apparat

Die Photosyntheseversuche wurden in konischen Warburggefäßen bei +15°C in einem Warburgapparat (Marke Braun) durchgeführt. Jedes Gefäß enthielt in 3 ml 80 μMol Tris pH 8, 5 μMol $MgCl_2$ und (wenn nicht anders angegeben) Chloroplastenfragmente oder P200 mit einem Chlorophyllgehalt von 0,4 mg, außerdem die bei der Beschreibung des Versuchs angegebenen Zusätze. In Versuchen zur Photophosphorylierung, Hill-Reaktion und NADP-Reduktion mit Elektronendonatoren wurden die Gefäße vor dem Versuchsbeginn 3 min. mit N_2 gespült, sodann (wenn nicht anders angegeben) 15 min. mit 35 000 Lux belichtet. Die O_2-Entwicklung der Hill-Reaktionen wurde manometrisch verfolgt. Zur chinon-stimulierten Ascorbat-Photooxidation wurden katalytische Mengen eines Hydrochinons (0,1 μMol Anthrachinonsulfonsäure) in den Seitenarm pipettiert, zur Hemmung der endogenen Katalase dem Ansatz 0,1 ml einer 10^{-2} m KCN-Lösung zugesetzt und die in Luft verlaufende Reaktion durch die Sauerstoffaufnahme manometrisch gemessen[9].

Zur ATP- und H_2O_2-Bestimmung wurden die Proben nach 15 min. Licht mit 0,2 ml 20%iger Trichloressigsäure gestoppt.
Zur Messung der Polyphenoloxidase-Aktivität wurden die enzymhaltigen Fraktionen in 80 µMol Phosphatpuffer pH 7 mit 20 µMol Dopamin zur Reaktion gebracht. Gemessen wurde die Sauerstoffaufnahme in 10 min. Dunkelreaktion mit Warburg Manometern.

Katalase-Test:
3 ml Versuchsansatz in konischen Warburggefäßen enthielten 80 µMole Phosphatpuffer pH 7 und 0,1 ml Perhydrol (1:50 verdünnt) im Seitenarm. Die Aktivität der Partikel wurde auf gleichen Chlorophyllwert bezogen. Gemessen wurde die Sauerstoffentwicklung, wobei jede Minute der Manometerstand abgelesen wurde. Die Reaktion ist in 6 min. beendet.

Gradienten-Zentrifugation:
Zur weiteren Auftrennung der Partikel P200 wurde ein Gradient mit einem Dichteanstieg von 10 auf 40% Saccharose angefertigt. Dazu diente eine Mischapparatur, wie sie hier abgebildet ist:



Gef.1 ist gefüllt mit 40%iger Saccharose-Lösung, Hahn A ist geschlossen. Im luftdicht abgeschlossenen Gef.2 sind 10 ml 10%iger Saccharose-Lösung und ein Rührmagnet. Das Ausflußrohr aus Gef.2 endet am Boden eines Zentrifugenbechers von 35 ml Fassungsvermögen. Hahn A wird nach dem Einschalten des Rührmotors geöffnet und Hahn B auf 1 Tropfen/2 sec eingestellt.
Die Linearität des Gradienten bis fast an den Bechergrund kann verfolgt werden, wenn die Lösung in Gef.1 mit DCPIP angefärbt wird und von 25 ml im Becher je 2,5 ml aspiriert werden und die Extinktion der 10 Proben bei 600 mμ im Spektralphotometer verfolgt wird:
Es ergibt sich eine Gerade, die bei Probe 9 abknickt. Am Bechergrund geht der Gradient einer logarithmisch abnehmenden Konzentrationssteigerung entgegen, während die Konzentration der Saccharose im übrigen Teil des Zentrifugenbechers nach unten linear zunimmt.

Zusammenfassung

I. Die Chloroplasten höherer Pflanzen enthalten Kupfer. Durch Fragmentierung von Spinatchloroplasten mit Digitonin wurden die kupferhaltigen Proteine in Lösung gebracht. Ammoniumsulfat-Fraktionierung trennte die Kupferproteine und ergab, daß 80% des Kupfergehaltes von Spinatchloroplasten als latente Polyphenoloxidase und 20% als Plastocyanin vorliegen. Eine einfache Präparation für Plastocyanin aus Spinatblättern wird daraus entwickelt. Chloroplasten aus Primeln (Pr. malacoides) enthalten Plastocyanin aber keine Polyphenoloxidase.

II. Nach Differential- und Saccharosegradienten-Zentrifugation in der Ultrazentrifuge wurden bei 200 000 g Partikel aus Chloroplasten erhalten, die praktisch kupferfrei sind. In diesen Partikeln ist die Lichtreaktion II der Photosynthese (= Photooxidation des Wassers) entfernt oder inaktiviert worden. Die photosynthetische NADP-Reduktion konnte in diesen Partikeln durch Zugabe von Ferredoxin, Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase, Plastocyanin und eines künstlichen Elektronendonatorsystems reaktiviert werden. Die Raten der NADP-Reduktion in diesem System betrugen 40 µMol $NADPH_2$/mg Chlorophyll/Stunde. Da in diesen Partikeln die photosynthetische NADP-Reduktion plastocyanin-abhängig ist, stellt es ein enzymatisches Testsystem für Plastocyanin dar. Der Test ist mit 1 mµMol Plastocyanin gesättigt und spricht noch auf 0,1 mµMol Plastocyanin an. Aus der Eigenschaft der Reaktivierung der Partikel durch die verschiedenen Substanzen ergibt sich, daß Plastocyanin ein Elektronendonator für Pigmentsystem I ist. Es wird darin die physiologische Funktion des Plastocyanins gesehen.

III. In den gleichen digitonin-fragmentierten Chloroplasten wurde angereichertes Cytochrom f getestet. Cytochrom f zeigte keinerlei Stimulierung der Rate der NADP-Reduktion und konnte Plastocyanin nicht ersetzen. Die eigenen Ergebnisse über die Rolle von

Cytochrom f und Plastocyanin in digitonin-fragmentierten Chloroplasten wurden mit dem derzeitigen Stand der Anschauungen über die Funktion von Plastocyanin und Cytochrom f im photosynthetischen Elektronentransport verglichen.

IV. Digitonin-fragmentierte Chloroplasten, die mit lipophilen Lösungsmitteln, wie Äthanol oder Heptan, behandelt wurden, zeigen zusätzlich zum Kofaktorbedürfnis der unbehandelten Chloroplasten eine Abhängigkeit von geringen Mengen eines Detergenzes. Dieser Befund wird so gedeutet, daß nur die Verteilung der Partikel im Mizell des Detergenzes den Funktionsort des Plastocyanins in der Struktur der Partikel öffnet und den Aus- und Eintritt des Plastocyanins ermöglicht.

V. Für die in Chloroplasten aus Spinat latente Polyphenoloxidase kann keine physiologische Funktion angegeben werden. Anfänglich unerklärliche Schwierigkeiten bei der NADP-Reduktion in digitonin-fragmentierten Chloroplasten im DCPIP-System konnten auf eine Störung durch die bei der Fragmentierung freigesetzte Polyphenoloxidase zurückgeführt werden. Die Polyphenoloxidase oxydiert reduziertes DCPIP, das wiederum über die Diaphorase-eigenschaft der Ferredoxin-NADP-Reduktase $NADPH_2$ oxydiert.

VI. Die gereinigte Polyphenoloxidase aus Chloroplasten hat keinen Einfluß auf photosynthetische Aktivitäten intakter Chloroplasten. Dagegen ist die Tyrosinase aus Kartoffeln ein spezifischer Entkoppler der Photophosphorylierung. Auch die Hexokinase wird durch Tyrosinase gehemmt. Kupferionen hemmen bei 10 γ die photosynthetische NADP- und Nitrit-Reduktion durch isolierte Chloroplasten, nicht aber andere Hill-Reaktionen. Kupferionen sind außerdem wie die Tyrosinase Entkoppler der ATP-Bildung.

Literaturverzeichnis

1) Zusammenfassung bei: A. Trebst, Neuere Vorstellungen über den Mechanismus der Photosynthese, Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Band LXXVII, Jahrgang 1964, Sondernummer 1. Generalversammlungsheft

2) M. Henninger and F. Crane, Information Exchange Group No.1 IEG 1, Scientific Memo 655 (1966)

3) J.S. Kahn and T.T. Bannister, Photochemistry and Photobiology. Vol.4 pp. 27-32 (1965)

J.S. Kahn and A.E. Purcell, Archives of Biochemistry and Biophysics, 112, 355-360 (1965)

4) M. Shin, K. Tagawa und D.I. Arnon: Biochem. Z. 338, 84 (1963)

5) I.L. Howland: Biochim. Biophys. Acta 77 (1963)

6) A. Trebst: Zeitschr. f. Naturforschung, 19b, H5 418 (1964)

A. Trebst und E. Pistorius: Zeitschr. f. Naturforschung, 20b, 143 (1965)

7) S. Ikeda, Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 17, 1 (1959); 18, 57 (1959)

8) Y. Chiba und S. Okayama, Plant and Cell Physiol. 3, 379 (1962)

9) A. Trebst, H. Eck and S. Wagner: in "Photosynthesis Mechanismus in Green Plants", National Academy of Sciences-National Research Council, 1963, S.174 f

10) L.F. Green, I.F. Mc Carthy and C.G. King: J. biol. Chemistry 128, 447 (1939)

11) A. Trebst: Z. Naturforschung, 18b, 817 (1963)

12) S. Katoh, Nature (London) 186, 533 (1960); S. Katoh u. A. Takamiya, Nature (London) 189, 665 (1961); S. Katoh, I. Suga, I. Shiratori u. A. Takamiya, Arch. Biochem. Biophysics, 94, 136 (1961)

13) S. Katoh und A. Takamiya, in: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants. National Academy of Sciences-National Research Council, Washington 1963

14) S. Katoh und A. Takamiya: Plant Cell Physiol. 4, 335 (1963)

15) B. Kok, in: Photosynthetic Mech. in Green Plants, Nat. Acad. of Science-National Res. Counc., Washington 1963

16) Y. de Kouchkovsky and D.C. Fork, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 1128 (1964)

17) B. Kok, H.J. Rurainski and E.A. Harmon, Plant Physiol. 39, 513 (1964)

18) D. Spencer and J.V. Possingham: Austral. J. biol. Sci. 13, 441 (1960)

19) A.C. Neish: Biochem. J. 33, 300 (1939)

20) F.R. Whatley, L. Ordini and D.I. Arnon: Plant Physiol. 26, 414 (1951)

21) R.H. Nieman and B. Vennesland: Plant Physiol. 34, 255 (1959)

22) F.R. Whatley, in: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants. Nat. Acad. of Sciences-Nat. Res. Council, Washington 1963

23) R.H. Nieman, H. Nakamura und B. Vennesland: Plant Physiol. 34, 262 (1959)

24) A. Trebst und E. Pistorius in: Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen; Kurt Mothes zum 65. Geburtstag - Festschrift, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1965

25) I.M. Anderson, N.K. Boardman und D.I. David: Biochem. and Biophys. Research Comm. 17, No.6, 685 (1964)

26) H.E. Davenport and R. Hill: Proc. Roy. Soc. 139, 337 (1952)

27) I.S.C. Wessels, Information Exchange Group No.1 IEG 1, Scientific Memo 698 1966

28) G. Forti, L. Bertole u. G. Zanetti: Biochem. Biophys. Acta 109, 33 (1965)

29) L.P. Vernon and E. Shaw: Plant Physiol. 40, No.6, 1269-1277 (1965)

30) A. Trebst und S. Wagner: Z.f. Naturforschung 17b, H6, 396 (1962)

31) E. Elstner, Zulassungsarbeit zum Staatsexamen, München 1963

32) O. Warburg, G. Krippahl, H.S. Gewitz u. W. Völker: Z. f. Naturforschung 9b, 769 (1954)

33) H.T. Witt et al.: Nature 197, 987 (1963)

34) L.N.M. Duysens et al.: Nature 190, 510 (1961)

35) B. Chance and W.D. Bonner jr. in: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants, Nat. Acad. of Sciences-National Research Council, Washington (1963)

36) D.S. Gorman and R.P. Levine: Proc. Nat. Acad. Sci., USA 54, 1665 (1966)

37) D.S. Gorman and R.P. Levine: Plant Physiol. 41, 1648 (1966)

38) I.W. Sizer, J. Biol. Chem. 169, 303 (1947)

39) A. San Pietro and H.M. Lang: J. Biol. Chem. 231, 211 (1958)

40) D.I. Arnon: Science 122, 3157 (1955)

M.B. Allen, D.I. Arnon, J.B. Capindale, F.R. Whatley u. L.J. Durham: J. Amer. chem. soc. 77, 4149 (1955)

41) Y. Sugino und Y. Miyoshi: J. biol. Chem. 239, 2360 (1964)

42) E.B. Sandell: Colormetic Determinations of Traces of Metals, Interscience Publishers Inc., New York (1959)

43) K. Tagawa u. D.I. Arnon: Nature (London) 195, 537 (1962)

44) M.K. Shin, K. Tagawa und D.I. Arnon: Biochem. Zeitschrift 338, 84 (1963)

45) F. Kubowitz: Biochem. Zeitschrift 299, 32 (1938)

Lebenslauf

Am 19.9.1939 wurde ich als erstes Kind des Fabrikangestellten Erich Elstner und seiner Ehefrau Hermine, geb. Seidl, in Neustadt/a.T. (Sudetenland) geboren. 1941 fiel mein Vater in Rußland, 1945 zog meine Mutter mit mir nach Bayern. Nach 4-jähriger Grundschulzeit in Altstädten/Allgäu besuchte ich die Oberrealschule in Oberstdorf, wo ich 1959 die Reifeprüfung ablegte. Nach 10-semestrigem Studium der Fächer Chemie, Biologie und Geographie an der Technischen Hochschule in München legte ich 1964 das Staatsexamen in diesen drei Fächern ab. Meine Zulassungsarbeit zum Staatsexamen fertigte ich im Organisch-Chemischen Institut der TH-München über das Thema: "Vergleichende Untersuchungen über Photosynthese- und Phenoloxidase-Reaktionen in isolierten Chloroplasten" in der Abteilung des damaligen Privatdozenten Dr. Trebst an.

Meine Doktorarbeit begann ich 1965 im WS am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen in der Abteilung Biochemie der Pflanzen unter der Leitung von Professor Dr. Trebst.

Meine akademischen Lehrer waren:
Prof. Dr. Kandler, Prof. Dr. Weygand, Prof. Dr. Hieber, Prof. Dr. Lux, Prof. Dr. Autrum, Prof. Dr. Lindauer, Prof. Dr. Jacobs, Prof. Dr. Hartke, Prof. Dr. Louis in München und Prof. Dr. Trebst, Prof. Dr. Pirson, Prof. Dr. Schlegel, Prof. Dr. Pfennig in Göttingen .